

**Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und
entzündlicher Reaktionen in der Pathogenese
arteriosklerotischer und hypertensiver Gefäßschäden**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité

Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Ralf Dechend

geboren am 20.05.1966 in Hannover

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Eingereicht am: September 2003

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 17. Mai 2004

Gutachter: 1. Univ-Prof. Dr. Rolf A.K. Stahl, Uniklinik Eppendorf, Med. Klinik IVI

2. Univ-Prof. Dr. V. Hombach, Universitätsklinikum Ulm, Inneren II

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	5
1.1	Vorwort	5
1.2	Einleitung: Chronische Entzündungsprozesse und Pathogenese der Gefäßveränderungen bei Hypertonie und Arteriosklerose	9
1.2.1	Arterielle Hypertonie	9
1.2.2	Arteriosklerose	10
1.2.3	Die Bedeutung der chronischen Entzündungsreaktion	13
1.3	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B und seine Bedeutung in der Entzündungsreaktion	16
1.3.1	Einleitung	16
1.3.2	Physiologie von NF- κ B	16
1.3.3	Physiologie von I κ B	18
1.3.4	Funktion von NF- κ B	19
1.3.5	therapeutische Interventionsmöglichkeit	21
1.4	Zielstellung der Untersuchungen	23
2	Darstellung der einzelnen Studienergebnisse	25
2.1	Projekt 1: Identifikation von Interaktionspartnern für Bcl-3/I κ B	25
2.1.1	Einleitung: Bcl-3 Struktur und Funktion	25
2.1.2	Fragestellung	26
2.1.3	Ergebnisse	27
2.1.3.1	Voruntersuchungen	27
2.1.3.2	Screening mit Bcl-3 (120-359) als Köderprotein	28
2.1.3.3	Interaktion der Bcl-3-Bindungspartner mit verschiedenen Proteinen, die Ankyrin-Repeats enthalten	30
2.1.3.4	Deletionsmutationen in den Bcl-3-Ankyrin-Repeats und der Einfluß auf das Interaktionsverhalten im Yeast-Two-Hybrid-System	31
2.1.3.5	Überprüfung der Bcl-3-Interaktionen	32

2.1.3.6	Bandshiftanalyse von Bcl-3 und interagierenden Klonen	35
2.1.3.7	Einfluß der Interaktionspartner auf die endogene NF- κ B-Aktivität	37
2.1.3.8	Transiente Transfektionen und Reporter-genaktivitäten	38
2.1.4	Diskussion und Ausblick	42
2.2	Projekt 2: Infektion von <i>Chlamydia pneumoniae</i> und NF- κ B-Aktivierung in Zellen der Gefäßwand	45
2.2.1	Einleitung	45
2.2.2	Fragestellung	46
2.2.3	Ergebnisse	48
2.2.3.1	Reprint Paper 2	48
2.2.3.2	Signaltransduktion in glatten Muskelzellen nach Infektion mit <i>C. pneumoniae</i>	49
2.2.3.3	Reprint Paper 3	58
2.2.4	Diskussion und Ausblick	59
2.3	Projekt 3: Der Einfluss des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie von Entzündungsreaktionen auf den Angiotensin II- vermittelten kardiovaskulären Endorganschaden	64
2.3.1	Einleitung	64
2.3.2	Fragestellung	65
2.3.3	Ergebnisse und Darstellung einzelner Studienergebnisse	66
2.3.3.1	Die Wirkung von Renin-Inhibitoren, ACE-Hemmern, AT1-Rezeptor antagonistien sowie blutdrucksenkenden Substanzen auf Tissue Faktor und den Ang II-vermittelten Endorganschaden (Reprint P4)	66
2.3.3.2	Reprint P 4	73
2.3.3.3	Die Wirkung von anti-entzündlichen und immunsuppressiven Inhibitoren auf NF- κ B, Entzündung und den Ang II-vermittelten Endorganschaden (Reprint P5 und P6)	74
2.3.3.4	Reprint P 5	76
2.3.3.5	Reprint P 6	77

2.3.3.6	Die Untersuchung des cholesterinunabhängigen Wirkmechanismuses von Statinen <i>in-vivo und in-vitro</i> (Reprint P7)	78
2.3.4	Diskussion und Ausblick	81
2.4	Projekt 4: Die Bedeutung aktivierender Autoantikörper gegen den Angiotensin 1-Rezeptor und der Entzündungsreaktion in der Präeklampsie	87
2.4.1	Einleitung	87
2.4.1.1	Allgemeines	87
2.4.1.2	Pathologische Veränderungen sowohl der Plazenta und des präplazentaren Gefäßbettes als auch extraplazentarer Organe	88
2.4.1.3	Hypothesen der Präeklampsieentstehung	90
2.4.1.4	Vorarbeiten	91
2.4.2	Fragestellung	94
2.4.3	Ergebnisse	94
2.4.3.1	Aktivierung des Tissue Faktors	94
2.4.3.2	Reprint Paper P8	96
2.4.3.3	Aktivierung der NADPH-Oxidase und redoxsensitive Signaltransduktion	97
2.4.3.4	Reprint Paper P9	99
2.4.3.5	Reprint Editorial	100
2.4.4	Diskussion und Ausblick	101
	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung	124
	Eidesstattliche Versicherung	126
	Lebenslauf	127

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Vorwort

Diese Habilitationsarbeit beruht im Wesentlichen auf dem Inhalt der nachfolgend aufgelisteten Publikationen (**P1 – 20**), von denen die wichtigsten, P1 – P9, im Hauptteil der Habilitationsarbeit zusammengestellt sind. Damit wird die nach der neuen Habilitationsordnung vom 29. Januar 1999 gegebene Möglichkeit „zur Vorlage publizierter Forschungsergebnisse, die in ihrer Gesamtheit eine einer Habilitationsschrift gleichwertige wissenschaftliche Leistung darstellen“ genutzt. Weitere Publikationen des Habilitanden, die nicht in dieser Arbeit verwertet wurden, sind in einem separaten Schriftenverzeichnis aufgeführt.

- P1** Dechend R, Hirano F, Lehmann, Vigo Heissmeyer V, Ansieau S, Wulczyn FG, Scheidereit C, Leutz A The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators *Oncogene* 1999;18:3316-23
- P2** Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, Gulba *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF- κ B and induces tissue factor and PAI-1 expression : A potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* 1999;100:1369-73
- P3** Dechend R, J Gieffers, R Dietz, A Joerres, J Rupp, FC Luft, M Maass HMG-CoA Reductase Inhibition Reduces *Chlamydia pneumoniae*-induced Cell Interaction And Activation, *Circulation* 2003, 108; 261-265
- P4** Dechend R*, DN Müller*, EMA. Mervaala*, A Fiebeler, JK Park, F Schmidt, J Theuer, V Breu, N Mackman, T Luther, DC Gulba, D Ganten, H Haller, FC Luft AT1 receptor blockade reduces tissue factor via inhibition of NF- κ B and AP-1 in angiotensin II-induced cardiac damage *Am J Pathol.* 2000;157:111-22

- P5** Dechend R*, Müller DN*, Mervaala EMA, Schmidt F, Park J-K, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Inhibition of NF- κ B protects against end-organ damage in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000, 35: 193-201
- P6** Dechend R*, Muller DN*, Heissmeyer V*, Hampich F, Park JK, Fiebeler A, Shagdarsuren E, Theuer J, Pilz B, Breu V, Schroer K, Ganten D, Dietz R, Haller H, Scheidereit, C, Luft FC. Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage. *FASEB J.* 2001 ;15:1822-4
- P7** Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Muller DN, Theuer J, Mervaala E, Bieringer M, Gulba D, Dietz R, Luft FC, Haller H. Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor. *Circulation.* 2001 ;104: 576-81.
- P8** Dechend R, V Homuth, G Wallukat, J Kreuzer, JK Park, J Theuer, A Juepner, DC Gulba, N Mackman, H Haller, FC. Luft AT₁ Receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor *Circulation* 2000 ;101:2382-2387
- P9** Dechend R, Viedt C , Müller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V , Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC, AT₁ receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH-Oxidase *Circulation*, 2003 1;107:1632-9.

Die im weiteren aufgeführten Publikationen sind nicht als pdf dargestellt. Die Ergebnisse haben aber zur der Habilitationsschrift beigetragen und sind im Text verwendet worden.

- P10** Park J-K, Müller DN, Mervaala EMA, Fiebeler A, **Dechend R**, Schmidt F, Bieringer M, Ganten D, Luft FC, Haller H. Inhibition of NF- κ B protects against end-organ damage in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Kidney Int.* 2000; 58: 1420-30.
- P11** Viedt C, **Dechend R**, Fei J, Hansch GM, Kreuzer J, Orth SR. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1534-47
- P12** Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, **Dechend R**, Mervaala E, Hampich F, Fiebeler A, Ju X, Theuer J, Viedt C, Kreuzer J, Heidecke H, Haller H, Zenke M, Luft FC. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol.* 2002; 161: 1679-93
- P13** Gueler F, Rong S, Park JK, Fiebeler A, Menne J, Elger M, Mueller DN, Hampich F, **Dechend R**, Kunter U, Luft FC, Haller H. Postischemic acute renal failure is reduced by short-term statin treatment in a rat model. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 2288-98
- P14** Muller DN, Mullally A, **Dechend R**, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Löffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aepli JD, Haller H, Luft FC. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension.* 2002;40:840-6.
- P15** Park JK, Fiebeler A, Muller DN, Mervaala EM, **Dechend R**, Abou-Rebyeh F, Luft FC, Haller H. Lacidipine inhibits adhesion molecule and oxidase expression independent of blood pressure reduction in angiotensin-induced vascular injury. *Hypertension.* 2002;39:685-9.

- P16** Muller DN, Mullally A, **Dechend R**, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Löffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aebi JD, Haller H, Luft FC. Endothelin-Converting Enzyme Inhibition Ameliorates Ang II-Induced Cardiac Damage. Hypertension. 2002;40: 840-6.
- P17** Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, Park JK, **Dechend R**, Bieringer M, Shagdarsuren E, Breu V, Haller H, Luft FC. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. Hypertension. 2001 ;37: 787-93.
- P18** Mervaala EMA, Müller DN, Park JK, Schmidt F, **Dechend R**, Fiebeler A, Bieringer M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Cyclosporine A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes Hypertension 2000, 35: 360-366
- P19** Muller DN, Mervaala EMA, Schmidt F, Park JK, **Dechend R**, Breu V, Löffler BM, Schneider W, Ganten D, Haller H, Luft FC Bosentan ameliorates end-organ damage by inhibiting inflammation in rats with high human renin hypertension Hypertension. 2000;36:282-290
- P20** Ansieau S, Kowentz-Leutz E, **Dechend R**, Leutz A B-Myb: a repressed trans-activating protein J Mol Med 1997; 75: 815-819

1.2 Einleitung: Chronische Entzündungsprozesse und Pathogenese der Gefäßveränderungen bei Hypertonie und Arteriosklerose

1.2.1 Arterielle Hypertonie

Die Hypertonie gehört zu den führenden Risikofaktoren bei der Ausbildung arteriosklerotischer Gefäßwandläsionen.¹ In den industrialisierten Ländern ist die Hypertonie heute sogar der bedeutendste Risikofaktor für die Arteriosklerose.² In den USA und Europa sind etwa 15 % bis 30 % der erwachsenen Bevölkerung nach den von den WHO-Kriterien als Hypertoniker zu bezeichnen. Gut 95 % aller Hypertonien sind primäre oder essentielle Hypertonien, d.h. dass keine organische Ursache nachweisbar ist.³ Epidemiologische Untersuchungen haben eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Blutdrucks und der Morbidität und Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen. Eine blutdrucksenkende Therapie vermindert das kardiovaskuläre Risiko und verlängert die Lebenserwartung.⁴ Die initiiierenden wie auch die perpetuierenden Mechanismen der Hypertonie und in deren Folge die Arteriosklerose sind im Detail nicht erschöpfend geklärt.⁵ Ziel der hier dargelegten Untersuchungen ist es, molekulare Mechanismen in der vaskulären Biologie zu identifizieren, die zum Verständnis der pathophysiologischen Gefäßreaktion beitragen.

Die Pathogenese der Hypertonie ist ein multifaktorieller Prozess, welcher die Interaktion von genetischen und Umweltfaktoren involviert.⁶ Die Pathophysiologie der Hypertonie beinhaltet u.a. Veränderungen der Nierenfunktion, eine gesteigerte Aktivität des Renin - Angiotensin - Systems und eine sympathische Hyperaktivität.⁷ In unterschiedlicher Ausprägung tragen Abnormalitäten der Volumenregulation, eine endotheliale Dysfunktion mit verstärkter Vasokonstriktion sowie Veränderungen der Arterienwand zur Ausbildung einer Hypertonie bei.⁸

Das „International Atherosclerosis Project“ war eine der ersten Studien, welche schwerere und diffus auftretende arteriosklerotische Läsionen bei Hypertonikern im Vergleich mit Normotonikern nachwies. Klinische und experimentelle Daten zeigen,

dass hoher Blutdruck die Entwicklung der Arteriosklerose fördert, insbesondere lassen sich eine erhöhte Inzidenz zerebrovaskulärer Erkrankungen und der koronaren Herzkrankheit nachweisen.⁹ Nach der Framingham Studie besteht bei 35-64 jährigen Patienten mit Hypertonie im Vergleich zu Normotonikern ein zwei- bis vierfach höheres Risiko, ein schweres kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden.¹⁰ Wichtige tierexperimentelle Daten zeigen, dass der Hypertonus die lipid-induzierte Arteriosklerose verstärkt und die Reduktion des Blutdruckes eine Regredienz der pathologischen Veränderungen bewirkt. Die Arteriosklerose stellt eine chronische Entzündung im Subendothelium dar, welche durch Lipidablagerungen - insbesondere von "Low-density" - Lipoproteinen (LDL) - unterhalten wird.¹¹

1.2.2 Arteriosklerose

Bereits 1925 wurden Fettstreifen („fatty streaks“) an Arterien von Kindern im Detail beschrieben, und es wurde vermutet, dass hier der Ausgangspunkt für die Entwicklung von komplizierten Plaques zu suchen ist.¹² Diese These gilt heute immer noch. Nach dem histologischen Bild teilt man die arteriosklerotischen Wandveränderungen in unterschiedliche Stadien ein (Abbildung 1, modifiziert nach R. Ross).¹³ Die erwähnten Frühveränderungen sind Lipidflecke, die sich durch Ansammlung von lipid- und cholesterinüberladenen Makrophagen im subendothelialen Raum bilden und die zusammen mit den im weiteren Verlauf entstehenden lipidangereicherten glatten Muskelzellen die Schaumzellen bilden (Stadium I und II).¹⁴ Diese im Anfangsstadium beteiligten Zellen sind klassische Komponenten eines chronisch entzündlichen Prozesses, der in die Migration und Proliferation arterieller glatter Muskelzellen mündet. Im weiteren Verlauf findet man im Prä-Atherom (Stadium III) extrazellulär vorkommende Lipide, die im IV. Stadium zu einem Lipidkern zusammengewachsen sind, was wiederum mit massiven strukturellen Schädigungen der Intima verbunden ist.

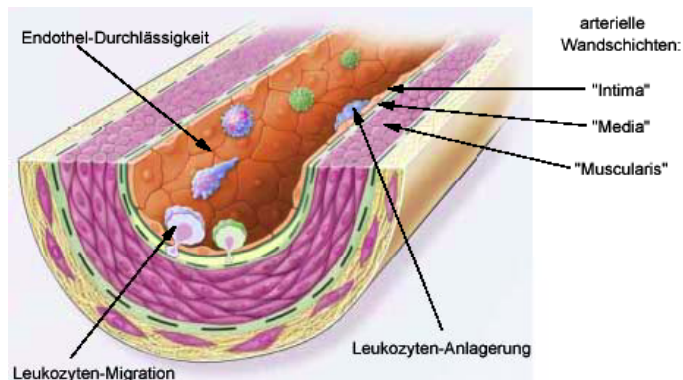
In diesem Stadium lassen sich auch eindeutig feste Bestandteile wie Kalk und Cholesterinkristalle nachweisen. Im Gegensatz zu Kalk und fibrösem Material können

weiche Fetteinlagerungen aus der Gefäßwand abtransportiert werden, wenn die Ursache der Fetteinlagerung beseitigt ist. Durch lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommt es zu einer Aktivierung glatter Muskelzellen, die in die Intima einwandern und dort proliferieren. Kennzeichen fortgeschrittener Arteriosklerose ist das Auftreten fibro-atheromatöser Plaques (Stadium V) mit der Entwicklung deutlicher Kollagenschichten und Vermehrung von glatten Muskelzellen über dem Lipidkern.¹⁵

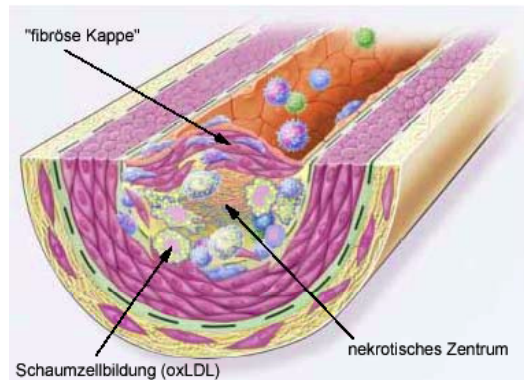
Durch fortschreitende Endothelläsionen ist die Produktion endothelialer Mediatoren wie NO, Prostacyclin und endothelialer Plasminogen-Aktivatoren gestört.¹⁶ Es kommt zur Anlagerung von thrombotischem Material, wodurch das Lumen verengt und so die Blutversorgung lebenswichtiger Organe gefährdet wird. Für den Gefäßverschluß bei Myokardinfarkt oder Apoplex sind meistens Thrombosen verantwortlich.¹⁷

Alle Entwicklungsstadien der arteriosklerotischen Plaques sind durch eine Ansammlung von immunkompetenten Zellen, d.h. von Monozyten und Lymphozyten, gekennzeichnet.^{18,19} Immunchemisch konnte gezeigt werden, dass es bereits vor der Bildung der Lipidplaques zu einer Ansammlung von Blutmonozyten in der Gefäßwandintima kommt.²⁰ Diese vermehrte Adhärenz von Monozyten an das Endothel wird unter anderem durch erhöhte LDL-Plasmaspiegel induziert²¹, da oxidiertes LDL gemäß der "response-to-injury"-Hypothese zu einer proinflammatorischen Veränderung des Gefäßendothels führt.^{13,22} Oxidiertes LDL wirkt chemotaktisch auf Monozyten und unterstützt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen.²⁰ Es kommt zur Adhäsion und subendothelialen Migration von Monozyten, die durch die Aufnahme von oxidiertem LDL zu Schaumzellen werden.²³ In der Plaque kommt es zur Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF β und Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-8 sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen.^{13,24,25}

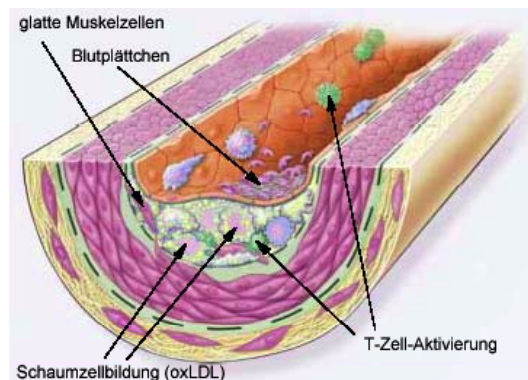
Stadium I



Stadium II



Stadium III



Stadium IV

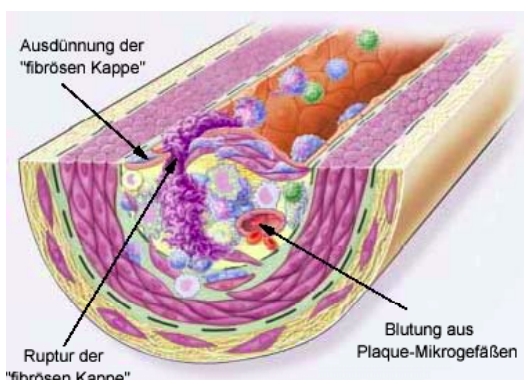


Abbildung 1: Die Gefäßveränderungen in der Arteriosklerose nach Ross

Die bekannten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum und Diabetes mellitus, gehen mit einem Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation einher.²⁶ Dieser Verlust der NO-vermittelten Gefäßerweiterung ist das Kennzeichen einer "endothelialen Dysfunktion", die bereits in der Frühphase der Arteriosklerose nachweisbar und ursächlich mit dieser Erkrankung verbunden ist.²⁷ Es kommt zu einer Endothelzellaktivierung, die durch eine Expression von Adhäsionsmolekülen wie "Vascular Cell Adhesion Molecule-1" (VCAM-1), "Intercellular Adhesion Molecule-1" (ICAM-1) und "Endothelial-leukocyte Adhesion Molecule-1" (E-Selektin) charakterisiert ist und eine Ankopplung zirkulierender Leukozyten an das Endothel bewirkt.²⁸

1.2.3 Die Bedeutung der chronischen Entzündungsreaktion

Das Verständnis der Pathogenese der Arteriosklerose ist in den letzten 20 Jahren revolutioniert worden. Wesentlich zu dem modernen Verständnis dieser chronischen Erkrankung beigetragen haben die Arbeiten von R. Ross, der in den 70er Jahren die „Response to injury“ Hypothese formulierte.^{13,26} Im Laufe der Jahre wurde diese Hypothese modifiziert und den neuen Erkenntnissen angepaßt, ist aber in ihrem grundlegenden Gedanken auch heute noch wichtig. Zunächst stand die Reaktion der glatten Muskelzellen im Vordergrund der Forschung.^{13,29} Die ursprüngliche Hypothese besagte, dass Veränderungen an den glatten Muskelzellen den Ausgangspunkt für Thrombozytenaggregate darstellen, die wiederum durch Freigabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF, eine Kaskade von Ereignissen triggern, die letztendlich in der arteriosklerotischen Läsion enden.³⁰ Nach diesen Vorstellungen sind die die Intima auskleidenden Endothelzellen wiederholten oder kontinuierlichen Angriffen auf die Integrität ausgesetzt. In den letzten Jahren hat jedoch ein Paradigmawechsel stattgefunden, der davon ausgeht, dass bei der Hypertonie und der Arteriosklerose das Endothel der zentrale Angriffspunkt, der zu einer chronischen Entzündungsreaktion führt, ist.³¹ Die Arteriosklerose, aber auch die arterielle Hypertonie, sind assoziiert mit morphologischen und funktionellen Alterationen des Endothels. Die arteriosklerotischen Veränderungen entstehen durch eine chronische pro-inflammatorische Reaktion.³² Die morphologischen Veränderungen dieser chronischen Entzündungsreaktion beinhalten die subendotheliale Akkumulation von Fibrin, zelluläre Infiltrationen sowie eine Schwellung der Endothelzellen. Funktionell alteriert ist die Endothel-abhängige Regulation des Gefäßtonus, einschließlich der NO, Endothelin und Cyclooxygenase vermittelten Prozesse.^{29,33} Als Resultat finden sich kleinste Veränderungen der arteriellen Endothelzellauskleidung sowie der zirkulierenden Monozyten. Diese geringen Verletzungen des Endothels können zu funktionellen Veränderungen der Zellen und zu einer gesteigerten Monozytenadhärenz führen.³¹

Arteriosklerose und Hypertonie sind verwandte Krankheitsentitäten.³⁴ Daher sind die molekularen Mechanismen an den Gefäßen ähnlich, jedoch nicht im Detail verstanden. Die zur Zeit allgemein vertretene Auffassung besagt, dass die frühen Stadien der Arteriosklerose einem entzündungsähnlichen Prozeß³⁵ gleichen, der durch die Einlagerung von Lipoproteinen in die Gefäßwand induziert wird und zunächst als ein reparativer Prozeß verstanden werden kann, der jedoch, wenn er überhand nimmt und chronisch bleibt, zu einer Zerstörung des Organs „Gefäß“ führt.³⁶ Atherogene Stimulanzen, wie erhöhte LDL-Konzentrationen, initiieren die Entzündungsreaktion durch Mechanismen, die die Rekrutierung von Monozyten und oxidativen Stress auszulösen.³⁷ Zudem werden auch pathogene Mikroorganismen und ihre Produkte als Ko-Faktoren für Initiation und Progression der Arteriosklerose diskutiert.²¹ Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist der Hauptschalter bei der Aktivierung der Gene, die zu der Aktivierung von Leukozyten und zu der Entwicklung der Entzündungsreaktion führen.³⁸

Die Hypertonie und Arteriosklerose sind in der Tat durch eine verstärkte Rekrutierung mononukleärer Zellen in der Intima charakterisiert.³³ Arterien von Hypertonikern sind verdickt, die Zellen der glatten Muskulatur können vermehrt sein, und es findet sich eine erhöhte Ablagerung von Bindegewebe. In der Tat ist die mit der Hypertonie vergesellschaftete Arteriosklerose charakterisiert durch eine entzündliche proliferative Reaktion der Gefäßwand.³⁹ Das Hauptmerkmal der Entwicklung einer Gefäßläsion im Rahmen von Hypertonie und Arteriosklerose ist eine Ansammlung von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen innerhalb der Arterien in Arealen mit niedrigem Scherstress.⁴⁰ Eine vermehrte Proliferation von Zellen glatter Muskulatur in der Media mit einer zunehmenden Ablagerung von Bindegewebe und einer vermehrten Neovaskularisierung zeichnen die pathophysiologischen Veränderungen bei Arteriosklerose und arterieller Hypertonie aus.⁴¹

Eine besondere Form der arteriellen Hypertonie stellt die Präeklampsie dar.⁴² Präeklampsie ist definiert als ein Anstieg des Blutdrucks nach der 20.

Schwangerschaftswoche auf ($>140/90$ mm Hg) mit Proteinurie (> 300 mg/l) in Patientinnen, die vorher keine Hypertonie oder Nierenveränderungen aufgewiesen haben. Präeklampsie ist eine Hauptursache für mütterliche Morbidität und Mortalität sowie die Hauptursache für kindliche Frühgeburtlichkeit und Morbidität.⁴³ Ein besonderes Phänomen der Präeklampsie ist, dass die gefäßbedingten Veränderungen foudroyant verlaufen und innerhalb weniger Wochen Veränderungen sichtbar werden, die bei anderen Formen der Hypertonie viele Jahre benötigen.⁴⁴ Es wird ein akuter arteriosklerotischer Prozeß der Basilararterien, und zwar in ihrem myometrialen Abschnitt und am Übergang zur intradezidualen Spiralarterienstrecke, beobachtet. Dabei treten fibrinoide Wandnekrosen, eine diffuse Fibrininsudation, Lipidakkumulation, Makrophagen und perivaskuläre monozytäre Infiltrate sowie zusätzliche Fibrinthromben auf.⁴⁵ Insofern ist die Präeklampsie ein Modell für Hypertonie-bedingte Gefäßveränderungen. Die Ursache für Präeklampsie ist trotz intensiver Forschung ungeklärt.⁴⁶ Nach dem jetzigen Stand der Wissenschaft aber sind eine chronisch Entzündungsreaktion, eine immunologische Komponente und eine Fehlregulation des Renin-Angiotensin Systems in dem Krankheitsprozess sehr involviert.^{47,48}

In Anbetracht der Interaktionen von Arteriosklerose und arterieller Hypertonie scheint es sinnvoll, Mechanismen anzunehmen, die beiden gemeinsam sind. Zu diesen potentiellen Mechanismen gehören: eine endotheliale Dysfunktion, eine erhöhte Permeabilität des Endothels für Lipoproteine, eine erhöhte Adhärenz mononukleärer Zellen und erhöhter oxidativer sowie hämodynamischer Stress, welcher eine Plaqueruptur triggern kann.⁴¹ In beiden Prozessen ist eine chronische Entzündungsreaktion ein Schlüsselereignis und für die pathophysiologischen Prozesse in der Gefäßwand verantwortlich. Die hier aufgezeigten Untersuchungen befassen sich mit dieser Problematik.

1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B und seine Bedeutung in der Entzündungsreaktion

1.3.1 Einleitung

Die verschiedenen Zellen der Gefäßwand reagieren auf verschiedenste Veränderungen in ihrer Umgebung mit einer spezifischen Genexpressionsantwort, die zu einer *de novo*-Proteinsynthese führt.⁴⁹ Diese Veränderungen werden in der Regel durch die verschiedenen Rezeptorsysteme ausgelöst, welche sich in der Zellmembran oder im Zytosol befinden und durch einen spezifischen Stimulus oder ein definiertes Spektrum an Stimuli aktiviert werden.³⁰ Dieser Aktivierung folgt eine komplexe Abfolge an Signalübertragungsvorgängen. Das letzte Glied einer solchen Signaltransduktionskaskade, das zur Genexpression führt, bilden die Transkriptionsfaktoren.^{50,51} Dies sind Proteine, die darauf spezialisiert sind, nach einer Aktivierung in den Zellkern der Zelle verlagert zu werden und die Transkription von Genen durch sequenzspezifische DNA-Bindung an regulatorische Promoter- und Enhancer-Einheiten zu regulieren.⁵²

Sen und Baltimore haben NF- κ B zuerst als Transkriptionsfaktor an einer charakteristischen DNA-Region, dem Immunglobulin-kappa-Ketten-Enhancer, in reifen B-Lymphozyten der Maus 1986 beschrieben.^{53,54} Die weiteren Analysen ergaben, dass NF- κ B sowohl in vielen immunologisch kompetenten Zellen als auch in sämtlichen Zellen der Gefäßwand, ja in fast allen Körperzellen durch unterschiedliche Stimuli freigesetzt wird und dass dadurch äußerst schnell zahlreiche Gene aktiviert werden können.⁵⁵ Viren, insbesondere auch Retroviren wie HTLV-1 und HIV-1, besitzen ebenfalls spezifische Bindungselemente für NF- κ B.⁵⁶⁻⁵⁸

1.3.2 Physiologie von NF- κ B

Es stellte sich heraus, dass NF- κ B ein pluripotenter Aktivierungsfaktor einer zellulären Antwort auf Veränderungen in der Umwelt ist.⁵⁹ Die Stimuli, welche NF- κ B aktivieren, reichen von physikalischem Stress (ionisierende Strahlung, UV-Strahlung,

Scherkräfte) über infektiöse Agenzien (wie Viren, Bakterien, Parasiten und ihre Produkte) bis hin zu biochemischen Reizen und zellulären Botenstoffen (wie den Zytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren).⁶⁰ Eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von NF- κ B nimmt oxidativer Stress in Form von H₂O₂ oder O²⁻ und Tumornekrose-Faktor α (TNF α) ein.^{61,62}

Der Vielfalt an Stimuli, die NF- κ B aktivieren können, steht eine nicht minder große Anzahl an Genen gegenüber, die durch NF- κ B reguliert werden. Diese noch nicht abgeschlossene Reihe reicht von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie z. B. Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, TNF α bis zu Granulozyten/ Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF).^{58,63}

In seiner aktiven Form liegt NF- κ B beim Menschen als Homo- oder Heterodimer vor.⁶⁴ Die Untereinheiten zeichnen sich durch die so genannte Rel-Homology-Domain (RHD) aus, eine ca. 300 Aminosäuren lange Region. Innerhalb dieser Domäne befinden sich die DNA-Bindestelle, das Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) sowie die Dimerisierungsregion.⁶⁵ Bisher sind fünf Mitglieder der NF- κ B/Rel-Familie bekannt: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52, p105/p50. Am häufigsten ist NF- κ B aus den Untereinheiten p50/p65 zusammengesetzt. p65 (RelA), RelB und c-Rel werden primär als transkriptionsaktivierende Proteine synthetisiert. p100/p52 und p105/p50 werden als 100 bzw. 105 kDa- Vorläuferprotein synthetisiert, das anschließend in eine 52 bzw. 50 kDa schwere transkriptionell aktive Form prozessiert wird.⁵⁵ NF- κ B bindet an verschiedene DNA-Erkennungsmotive, entsprechend der DNA-Konsensussequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' (R = Purin, Y = Pyrimidin). Die einzelnen Mitglieder der NF- κ B Familie binden mit unterschiedlich hoher Affinität und Spezifität auch an von dieser Konsensussequenz gering abweichende DNA-Sequenzen, wodurch rasch ein Netzwerk an unterschiedlichen Aktivierungsmustern der Zielgene erreicht wird.⁶⁶

Die NF- κ B-/I κ B-homologen Proteine Dorsal und Cactus sind bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* in der Embryogenese bei der dorso-ventralen Polarisation und zusammen mit den NF- κ B-homologen Proteinen Dif und Relish in der adulten

Fruchtfliege bei der unspezifischen Immunantwort von Bedeutung.⁶⁷ Die Signaltransduktion erfolgt über Toll, einen Rezeptor, der eine hohe Homologie zum humanen IL-1-Rezeptor aufweist. Eine für die Signalübertragung wesentliche Kinase ist Pelle, das Drosophila-Homolog zur humanen IRAK-Proteinfamilie.⁶⁸ Die Toll-Proteinfamilie zeichnet sich durch eine Region hoher Homologie, Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR) genannt, aus. Diese Domäne findet sich bisher in zahlreichen Rezeptoren und einem zytoplasmatischen Adapterprotein.⁶⁹

1.3.3 Physiologie von I κ B

Die präzise Regulation von Genexpression durch die NF- κ B/Rel Familie erfordert komplexe Mechanismen, welche die zelluläre Umgebung registrieren und auf eventuelle Veränderungen reagieren können.⁶³ NF- κ B liegt im Zytoplasma an eine inhibitorische Untereinheit, I κ B, gebunden vor.⁷⁰ Bislang wurden sieben I κ B-Moleküle identifiziert: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100 und p105. Allen I κ B-Molekülen gemeinsam ist eine sich wiederholende Region von 30–33 Aminosäuren, den so genannten Ankyrin-Repeats, die eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne darstellt.⁷¹ Die I κ B-Moleküle enthalten zusätzlich eine C-terminale Sequenz, die reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin ist.⁷² Diese sogenannte PEST-Sequenz ist essentiell für die schnelle Degradation der I κ B-Moleküle bei NF- κ B Aktivierung.⁷³ Das am besten analysierte I κ B-Molekül ist I κ B α . I κ B α inhibiert durch Maskierung des NLS die Translokation von NF- κ B in den Zellkern.⁶⁶ Eine Ankyrin-Repeat-Domäne mit anschließender PEST-Sequenz findet sich auch am carboxyterminalen Ende der Vorläuferproteine für p52 und p50 (p105 und p100). p105 und p100 fungieren als interne Inhibitoren durch Assoziation mit p65 oder c-Rel und sind ebenfalls Ziel von Phosphorylierungen und proteolytischer Spaltung nach Stimulierung mit TNF α , PMA oder LPS.⁷⁴ Die Phosphorylierung von I κ B α ist der erste Schritt für die Degradierung des Inhibitormoleküls, was anschließend durch die Ubiquitinilierung an Lysin 21 und Lysin 22 erfolgt, der die Degradierung durch das 26S-Proteasom einleitet.⁷⁵

Im weiteren konnte der Kinasenkomplex, der zur Degradation von I κ B führt, identifiziert werden.⁷¹ Zu ihnen gehören NEMO (NF- κ B essential modulator), welches an der Bildung des I κ K α /I κ K β -Komplexes beteiligt ist und heute auch I κ K γ genannt wird, sowie der Aktivator von I κ K α und I κ K β , die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK).^{66,76}

1.3.4 Funktion von NF- κ B

NF- κ B induziert zahlreiche Gene, die für entzündliche Prozesse und für die Akute-Phase-Reaktion relevant sind. Hierzu zählen insbesondere eine große Anzahl an proinflammatorisch-regulierenden Genen, zu denen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und zelluläre Rezeptoren gehören.⁷⁷ Einige werden jedoch nicht nur durch NF- κ B induziert, sondern sind auch selbst in der Lage, NF- κ B zu aktivieren, sodass sich hier ein sich selbst amplifizierender Zyklus ergibt.⁷⁸ Als Beispiel seien hier die pluripotenten Zytokine TNF α , IL-1 und IL-6 genannt, die zugleich auch die wichtigsten NF- κ B regulierten Akute-Phase-Regulatoren sind.⁶⁵

Ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Entzündungsprozessen ist die Rekrutierung von Granulozyten, Monozyten sowie T-Lymphozyten aus dem Kreislauf an den Ort der Entzündung.⁷⁹ Hierzu müssen Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1 und E-Selektin exprimiert werden um einerseits die Oberfläche der Endothelzellen für die Ansammlung und andererseits die Migration von immunologisch relevanten Zellen ins Zielgewebe vorzubereiten.⁸⁰

Ein Schlüssel liegt hierbei in der örtlichen Aktivierung von NF- κ B durch inflammatorische oder immunologische Reize, welche eine Stressreaktion mittels ROIs (Reactive Oxygen Intermediates) und Anschalten des pro-inflammatorischen Enzyms iNOS (inducible Nitric Oxidase Synthase) auslösen.⁸¹

Neben der breiten aktivierenden Wirkung auf Chemokine, Zytokine, Immunrezeptoren und Adhäsionsmoleküle wird bei zahlreichen chronisch-entzündlichen Prozessen eine erhöhte Expression der NF- κ B-induzierbaren iNOS Enzym vorgefunden: in den Epithelien der Atemwege und in Makrophagen von

Asthma-Patienten, in den Epithelien der Kolonschleimhaut bei Colitis ulcerosa , bei Lupus erythematoses und Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis.⁵⁸ NF- κ B ist in letzter Zeit in verschiedenen kardiologischen Fragestellungen untersucht worden.^{82,83} In tierexperimentellen Untersuchungen konnte durch die Hemmung von NF- κ B ein Myokardinfarkt in der Ratte nahezu verhindert werden.⁸⁴ Ritchie et al. konnten zeigen, dass NF- κ B selektiv in Patienten mit instabiler Angina pectoris aktiviert ist.⁸⁵ Brand et al. konnten zeigen, dass aktiviertes NF- κ B in arteriosklerotischem Gewebe in glatten Muskelzellen, Endothel und Makrophagen exprimiert ist.⁸⁶ Funktionelle Daten hierzu kamen aus den Arbeitsgruppen von Libby, die zeigen konnten, dass aktiviertes NF- κ B für die Proliferation von glatten Muskel- bzw. Endothelzellen notwendig ist.¹⁵ In einem Tiermodell an hypercholesterinämischen Kaninchen konnten Hernandez-Resa et al. zeigen, dass NF- κ B vor allem in den frühen Phasen der Plaqueentwicklung beteiligt ist.⁸⁷ Komplexe genetische Regressionsanalysen von Liao et al. haben einen gemeinsamen Zusammenhang für freie Sauerstoffradikale, oxidiertes LDL, die Entstehung von "fatty streaks" in der Aorta und einer NF- κ B-Aktivierung aufgezeigt.⁸⁸

NF- κ B ist in Makrophagen, Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Glomeruli und Tubuli beschrieben worden.³⁸ Ebenso ist der Transkriptionsfaktor in Fibroblasten und Kardiomyozyten identifiziert worden. Neben verschiedenen Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin-1 (IL-1) und TNF α , führt Angiotensin II (Ang II) zu einer Aktivierung von NF- κ B. Diese Aktivierung von NF- κ B durch eine chronische Ang II Stimulation ist für die Entstehung des Endorganschadens an Gefäßen in Niere und Herz besonders wichtig.⁸⁹

Stickoxid (NO), das Produkt der iNOS, vermag in Lymphozyten NF- κ B zu aktivieren.⁹⁰ Dieser positive autoregulatorische Mechanismus, ähnlich wie für TNF dargestellt, scheint hier jedoch zelltypspezifisch zu sein, da in Endothelzellen NO die Aktivierung von NF- κ B durch TNF α inhibieren kann. Wahrscheinlich liegt eine gleichzeitige Induktion von I κ B α zugrunde.⁹¹

Im Laufe der Zeit kristallisierten sich reaktive Sauerstoffradikale (ROI) als ein wichtiger Botenstoff bei der Aktivierung von NF- κ B und der Induktion von Entzündungsreaktionen heraus.⁶⁶ Die Aktivierung von NF- κ B durch H₂O₂ kann ebenfalls durch Präinkubation der Zellen mit Antioxidantien wie NAC (N-Acetylcystein), DITC (Dithiocarbamat) oder PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) wie auch dem Enzym Thioredoxin inhibiert werden.^{92,93} Dies weist auf eine Redoxkontrolle hin.⁶⁰ Die verstärkte Expression von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen kann so durch die Aktivierung von NF- κ B nach einer Reperfusion und somit Reoxygenierung von hypoxischem Gewebe ausgelöst werden.^{79,94}

Eine Induktion von NF- κ B durch Viren aktiviert zum einen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, die zur Aktivierung oder Verstärkung einer bestehenden entzündlichen Erkrankung führen können, zum anderen wird NF- κ B oft für die Replikation des Virus selbst ausgenutzt.⁵⁷ Zytomegalovirus (CMV) stimuliert NF- κ B und wird wiederum transkriptionell aktiviert durch NF- κ B.⁵⁵

Eine weitere wesentliche physiologische Bedeutung der NF- κ B-Aktivierung über TNF-Rezeptor-1 besteht in der antiapoptotischen Funktion.⁵⁶ Ein erster Hinweis hierfür kam durch p65 (RelA)-defiziente Mäuse, die intrauterin an einer Leberapoptose verstarben.⁹⁵ Auch hier hat man weitere wichtige Signaltransduktionswege identifiziert, an denen die durch NF- κ B regulierten c-IAPs (Inhibitors of Apoptosis) von besonderer Bedeutung sind. Die c-IAPs induzierten antiapoptotische Wirkung nach NF- κ B-Aktivierung.⁹⁶

1.3.5 therapeutische Interventionsmöglichkeit

NF- κ B ist maßgeblich an der Aktivierung zahlreicher für den Ablauf einer Entzündung relevanter Gene beteiligt.⁶⁶ Daher liegt der Versuch nahe, über diesen Faktor eine breite entzündungshemmende Wirkung zu erreichen.⁹⁰ Die Gruppe der Glukokortikosteroidhormone repräsentiert nach wie vor die klinisch bedeutsamsten Immunsuppressiva. Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikosteroide durch verschiedene Mechanismen NF- κ B inhibieren können.⁹⁷ Antiphlogistische

Substanzen wie Azetylsalizylsäure, Sulfasalazin, Pentoxiphyllin und Vitamin-A-Säure, vermitteln ihre Wirkung ebenfalls teilweise durch eine Inhibition von NF- κ B.⁵⁸ Azetylsalizylsäure und Sulfasalazin interferieren hierbei mit der Degradation von I κ B α und I κ B β .^{84,98}

Proteine der NF- κ B-Familie stehen bei fast allen inflammatorischen und immunologisch initiierten Reaktionen und bei Erkrankungen mit Einflussnahme der Apoptoseregulation (z.B. bei bestimmten Tumoren) als regulatorische Instanz funktionell oder als pathophysiologisch relevante Kandidatengene im Interesse der Forschung.^{99,100}

Bei Morbus Hodgkin, einem B-Zell-Lymphom, besteht eine besonders hohe Proliferationsrate der klonalen malignen Reed-Sternberg-Zellen mit Zellaktivierung und Zytokinproduktion bei gleichzeitiger hoher Aktivität von NF- κ B.¹⁰¹ Diese war lange Zeit durch eine NF- κ B-Transaktivierung durch Epstein-Barr-Virus-Proteine zu erklären.⁵⁷ Bei EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen konnten somatische Mutationen im I κ B α -Gen in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen und gleichzeitiger Verlust der I κ B α -Funktion identifiziert werden. Somit stellt eine genetische Veränderung mit Funktionsverlust des wichtigsten Kontrollproteins der NF- κ B-Signalkaskade einen definierten Ausgangspunkt für klonale Proliferation, Ausbleiben von apoptotischem Zelltod und somit für eine maligne Transformation in B-Lymphozyten dar.^{102,103}

Bei der seltenen X-chromosomal-dominant vererbten Erkrankung Incontinentia pigmenti konnte bei der größten Anzahl der Patientinnen an dem Schlüsselprotein für die Aktivierung von NF- κ B, NEMO (NF- κ B Essential Modulator)/I κ K γ , ein zugrunde liegender Defekt nachgewiesen werden.¹⁰⁴ Somit ist neben dem Morbus Hodgkin eine weitere Erkrankung mit Dysregulation der Zellproliferation und Apoptose pathogenetisch auf der Genebene mit Proteinen dieses Transkriptionsfaktorsystems assoziiert.^{102,105} Zukünftige Analysen mit transgenen Modellen und genetische Untersuchungen beim Menschen werden Aufschluss über pathophysiologische Zusammenhänge und therapeutische Möglichkeiten, auch die vaskuläre Medizin betreffend, geben.³⁸

1.4 Zielstellung der Untersuchungen

Die vorliegende Habilitationsschrift befasst sich mit folgenden Problemstellungen:

- Identifikation von Interaktionspartnern für Bcl-3, einem Mitglied der I κ B Familie. Auf Grund seiner nukleären und transaktivierenden Fähigkeiten hat Bcl-3 jedoch andere Funktionen, die aber unbekannt sind. Über die Identifikation von potentiellen Bindungspartnern für Bcl-3 sollen Rückschlüsse über die physiologische und pathophysiologische Funktion von Bcl-3/I κ B gezogen werden. Dazu wurde das Yeast-Two-Hybrid-System verwendet. Die Bindung zwischen Bcl-3 und den neu identifizierten Interaktionspartnern wurde in vitro und in vivo bestätigt. Anschließend wurde untersucht, ob der Interaktionspartner die Funktionseigenschaften von Bcl-3 verändert. Dabei wurde untersucht, ob die DNA-Bindungsaktivität und das transaktivierende Potential von p50/bcl-3 verändert wurden. (Projekt 1)
- Untersuchungen zur Signaltransduktion nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*. Neue Konzepte in der vaskulären Biologie unterstützen die Hypothese, dass eine chronische Entzündungsreaktion, ausgelöst durch den Erreger *C. pneumoniae*, ursächlich beteiligt sein könnte. Dabei wurde untersucht, ob NF- κ B nach Infektion mit *C.pneumoniae* aktiviert wird. Zudem wurden NF- κ B regulierte Gene untersucht, die zu einer Hyperkoagulabilität und Entzündung führen. Es wurden die Signaltransduktionswege untersucht, die zu der *C.pneumoniae* - induzierten NF- κ B-Aktivierung führen. Weiterhin wurde die Wechselwirkung zwischen infizierten glatten Muskelzellen und Entzündungszellen untersucht. (Projekt 2)
- Untersuchungen zum Mechanismus von Angiotensin II induziertem kardiovaskulärem Endorganschaden. Anhand eines doppeltransgenen Rattenmodells haben wir untersucht, ob das lokale Angiotensin II eine

Entzündungsreaktion induziert, die an der Ursache des Endorganschaden beteiligt ist. Anhand von verschiedenen Interventionsstudien haben wir die molekularen Mechanismen untersucht, insbesondere die Bedeutung einer Angiotensin II induzierten NF- κ B-Aktivierung. (Projekt 3)

- Wir haben Untersuchungen zur pathophysiologischen Ursache der Präeklampsie, einer Sonderform eines hypertoniebedingten Endorganschadens, durchgeführt. Die Bedeutung von aktivierenden Autoantikörpern gegen den Angiotensin 1-Rezeptor, die bei Patientinnen mit Präeklampsie beobachtet werden, sind in vitro untersucht worden. Dabei haben wir die Signaltransduktion der Autoantikörper in glatten Muskelzellen und Trophoblasten untersucht. Insbesondere die NF- κ B-Aktivierung sowie NF- κ B - regulierte Gene wurden untersucht. Weiterhin haben wir die Signaltransduktion untersucht, die zur NF- κ B-Aktivierung führt. (Projekt 4)

2 Darstellung der einzelnen Studienergebnisse

2.1 Projekt 1: Identifikation von Interaktionspartnern für Bcl-3/I κ B

2.1.1 Einleitung: Bcl-3 Struktur und Funktion

Das Onkoprotein Bcl-3 ist seiner Struktur nach mit den I κ B Faktoren eng verwandt.¹⁰⁶ Es wurde zuerst bei einer chronisch lymphozytären Leukämie identifiziert, die mit einer Translokation (14:19) des Bcl-3 Gens in den Immunglobulin-k-Genlocus einhergeht. Daraus resultiert eine erhöhte Expression des intakten Bcl-3 Proteins.¹⁰⁷ Im Gegensatz zu den I κ B-Molekülen, die zytoplasmatische Komplexe mit unterschiedlichen Rel-Faktoren (p50, p65, c-Rel) bilden und deren Translokation in den Kern inhibieren, ist Bcl-3 im Zellkern lokalisiert.¹⁰⁸ Zudem enthält Bcl-3 im Gegensatz zu den übrigen I κ B-Molekülen keine azide Domäne nach dem sechsten Ankyrin-Repeat, stattdessen einen verkürzten siebenten Repeat.¹⁰⁹ Die Ankyrin-Repeat-Domäne wird durch eine aminoterminaler Prolin-reiche (25 %) und eine carboxyterminale Prolin- und Serin-reiche (23 % und 28 %) Region flankiert, die dem Protein Transaktivator-Eigenschaften verleihen.¹¹⁰ Bcl-3 interagiert über seine Ankyrin-Repeat-Domäne mit der Dimerisierungsdomäne von p50 und p52 Homodimeren.⁷⁴

In-vivo Experimente zeigen, dass Bcl-3 als Transkriptionsaktivator fungieren kann.¹¹¹ Über die Wirkung von Bcl-3 in Assoziation mit dem p50- und dem p52-Homodimer gibt es widersprüchliche Daten. Einige Autoren haben einen direkt transkriptionsaktivierenden Einfluss von Bcl-3 in Assoziation mit dem p50- und dem p52-Homodimer gesehen, während p50- und p52- Homodimere allein nicht aktivieren.¹¹² Andere hingegen haben einen reprimierenden Einfluss von Bcl-3 auf p50- und p52- abhängige Aktivierungssysteme beschrieben.¹¹³ Die Diskrepanz der Daten bezüglich der funktionellen Spezifität von Bcl-3 kann auf unterschiedlichen experimentellen Bedingungen beruhen, die sich möglicherweise in Form verschiedener Modifikationen von Bcl-3 äußern könnten.^{114,115} Bei Bcl-3 handelt es sich um ein Phosphoprotein, das mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen

besitzt. Phosphoryliertes Bcl-3 inhibiert die DNA-Bindung von nukleärem p50-Homodimer, indem dieses von der κ B-Sequenz dissoziiert wird.¹¹⁶ Phosphatasebehandlung inaktiviert die inhibitorische Funktion von Bcl-3, so dass das p50-Homodimer an die DNA gebunden bleibt.¹¹⁷

Bisher sind für Bcl-3 nur wenige Interaktionspartner und Zielgene bekannt. Außer p50 und p52 aus der Rel-Familie bindet das Transmembranprotein Tan-1 an Bcl-3.¹¹⁸ Letzteres erfolgt durch die Interaktion der Ankyrin-Repeat-Domänen von Tan-1 und Bcl-3. Weiterhin wird Bcl-3 mit der Regulation von Muskelzelldifferenzierung in Zusammenhang gebracht. Als Zielgen von Bcl-3 konnte bisher das P-Selektin-Gen nachgewiesen werden, an dessen Promotersequenz p50 bzw. p52 als Homodimer binden kann.¹¹⁹

2.1.2 Fragestellung

Die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren und ihrer Inhibitoren ist maßgeblich an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt, die eine entscheidende physiologische und pathophysiologische Funktion ausüben. Über die physiologische Funktion von Bcl-3 im eukaryontischen Organismus ist bisher wenig bekannt. Aus diesen Gründen ist das Auffinden neuer Interaktionspartner von Bcl-3 von großem Interesse.

In dem vorliegenden Projekt wurden die folgenden Aufgaben bearbeitet:

- Screening mit Bcl-3 als Köderprotein im Yeast-Two-Hybrid-System, um neue Interaktionsproteine zu identifizieren. Da Bcl-3 als Transkriptionsaktivator allein transkriptionsaktivierende Aktivität hat, mussten Deletionsmutanten hergestellt werden, die kein Transaktivierungspotential besitzen.
- Charakterisierung der positiven Klone
- Überprüfung der Bcl-3 Interaktionen
- Biochemische Bestätigung der Bcl-3 Interaktionen
- In vivo Co-Immunopräzipitation von Bcl-3 und interagierenden Klonen

- Änderung der DNA-Bindungsaktivität von p50/Bcl-3 durch die interagierenden Klone
- Einfluss der Interaktionspartner auf die endogene NF- κ B-Aktivität
- Einfluss der Interaktionspartner auf die Transkriptionsaktivität von Bcl-3

2.1.3 Ergebnisse

2.1.3.1 Voruntersuchungen

Bei der Klonierung von verschiedenen Fragmenten des humanen Bcl-3-Gens in den Hefeexpressionsvektor pGBT9 (Köderplasmid) stellte sich heraus, dass sowohl das gesamte Bcl-3 Konstrukt (1-447) als auch ein C-terminal-deletiertes Konstrukt Bcl-3 Δ C (1-289) starke transkriptionsaktivierende Wirkung ausüben (Abbildung 2). Damit scheiden diese Konstrukte für das Screening im Yeast-Two-Hybrid-System aus. Konstrukte, welche nur die Ankyrin-Repeat Domäne von Bcl-3 beinhalten (120-359) zeigen keine transkriptionsaktivierende Aktivität. Die Untersuchung auf stabile Expression der Bcl-3-Konstrukte erfolgte durch zwei Methoden. Zum einen durch den immunologischen Nachweis mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bcl-3-Protein im Immunoblot. Zum anderen führte die Co-transfektion von p50, welches in den Vektor pGAD 424 (Beuteplasmid) kloniert wurde, gemeinsam mit dem Bcl-3-ARD (120-359) zur Induktion der beiden Reportergene lacZ und Histidin in das Yeast-Two-Hybrid-System.

bcl-3 Konstrukte

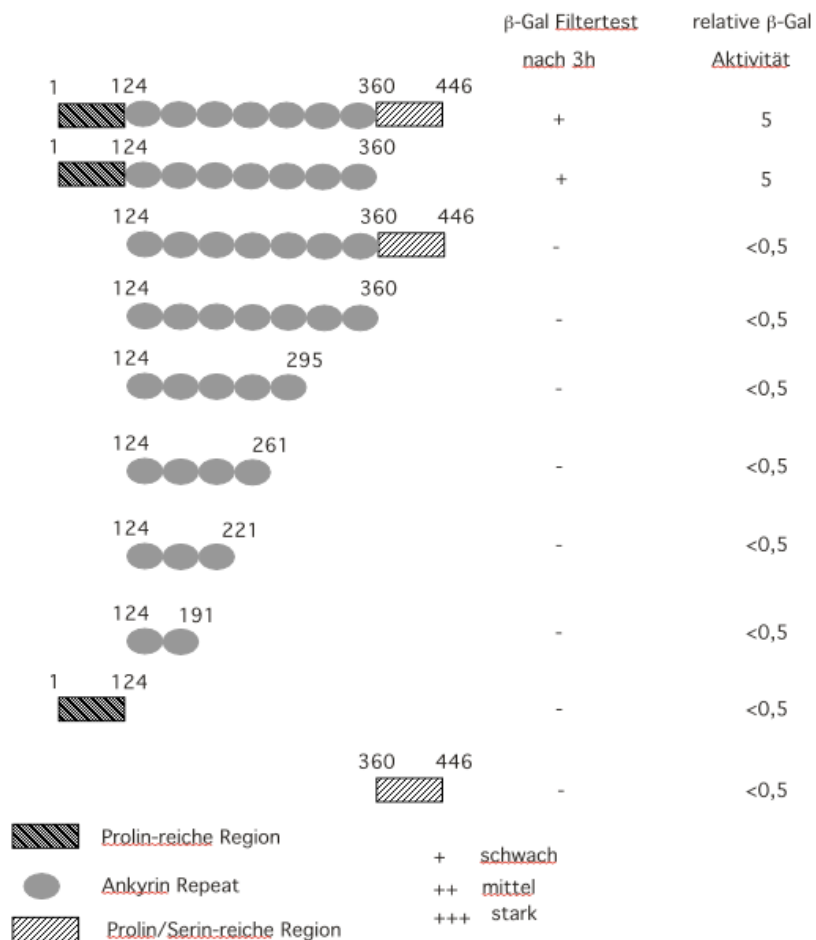


Abbildung 2: verschiedene Bcl-3 Konstrukte und ihr transaktivierendes Potential im Yeast-Two-Hybrid-System

2.1.3.2 Screening mit Bcl-3 (120-359) als Köderprotein

Eine Bibliothek aus aktivierten B-Zellen wurde insgesamt 3x mit dem Köderprotein in verschiedene Hefezellen transformiert (Abbildung 3). Die Bibliothek wurde unter stringenten und weniger stringenten Bedingungen durchsucht, um starke und schwache Interaktionen nachzuweisen. Bei jedem Experiment wurden jeweils 2×10^6 Hefekolonien durchgemustert und 8 Klone unter stringenten Bedingungen und 14 Klone unter weniger stringenten Bedingungen isoliert. Zur Verifizierung positiver Klone wurde deren DNA durch Elektroporation in E.coli HB101 isoliert und erneut mit dem Köderprotein Bcl-3 (120-359) co-transformiert. Neben dieser Bestätigungsreaktion erfolgte die Co-transformation mit dem leeren pGBT9 und

laminin-pGBT9, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Nach Durchführung dieser Kontrollen verblieben 12 positive Klone.

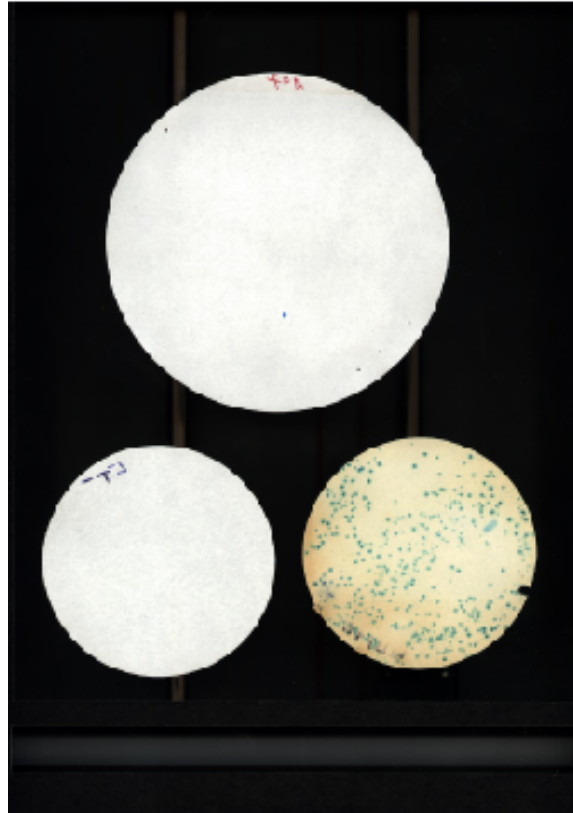


Abbildung 3: Das Yeast-Two-Hybrid-System ist ein genetischer in vivo-Screen, in dem wir Gal4-DNA-Bcl-3 als "Fänger" benutzt und gegen eine c-DNA Bibliothek, welche aus humanem aktivierten B-Zellen gewonnen und an die Gal4-Transaktivungsdomäne fusioniert wurde, getestet haben. In drei unabhängigen Screenings wurden 1×10^7 Kolonien analysiert, und nach allen nötigen Kontrollen konnten acht neue mögliche Interaktionspartner für Bcl-3 identifiziert werden.

Die c-DNAs der mit Bcl-3 (120-359) gefundenen Proteine wurden in 5'- und 3'-Richtung sequenziert. Dafür wurden sowohl manuelle als auch automatische Sequenziermethoden nach Sanger eingesetzt. Zur Homologiesuche wurden mit den sequenzierten Bereichen Datenbanken durchsucht. In der Tabelle 1 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 1: Bcl-3-interagierende Proteine

Klon Nr.	cDNA-Länge ¹²⁰	kodiertes Protein	Acession
1	1900	humanes Trip4, um 103 Aminosäuren N-terminal verlängert	L40371
2	800	EST aus humaner Colon cDNA-Genbank	AA045586
3	2200	unbekannt, Homologie zu Zinkfingermotiv des Proteins ZFP7 (Maus)	M29580
4	2000	humanes p52/NF-κB	X61498
5	850	humanes Pirin	Y07867
6	1250	humanes Jab1	U65928
7	1250	humanes Jab1	U65928
8	1500	humanes Tip60	U40989
9	1600	humanes Skip	U51432
10	900	humanes Bard	U76638
11	2900	humanes p50/NF-κB	M58603
12	2900	humanes p50/ NF-κB	M58603

2.1.3.3 Interaktion der Bcl-3-Bindungspartner mit verschiedenen Proteinen, die Ankyrin-Repeats enthalten

Um die Spezifität der Interaktion zwischen Bcl-3 und den Bindungspartnern zu testen, haben wir die Ankyrin-Repeats verschiedener Proteine an die Gal4-DNA-bindende Domäne fusioniert und im Yeast-Two-Hybrid-System gegen die Bcl-3-interagierenden Klone untersucht. (Tabelle 2) Dafür haben wir Ankyrin-Repeats mit verschiedener Homologie zu den Ankyrin-Repeats von Bcl-3 verwendet. Ankyrin-Repeats von IκBα, IκBβ und p105 zeigen eine hohe, die von Tan-1, dem humanen Homolog von Notch1, eine geringere und die von Bard1 eine weiter entfernte Homologie zu Bcl-3. Als Positivkontrolle haben wir p50 verwendet, welches mit den Ankyrin-Repeats von p105 und Bcl-3 interagiert. Keiner der Bcl-3-Interaktionspartner interagiert mit den Ankyrin-Repeats von Bard1. Skip und Trip4 interagieren mit allen Ankyrin Repeats, die wir getestet haben mit Ausnahme der von Bard1. Pirin und Tip60 interagieren, analog zu p50, mit einem Mitglied der NF-κB Familie zusätzlich

zu Bcl-3: nämlich interagiert Tip60 mit Tan-1, Pirin mit I κ B α und Jab1 mit p105. Bard1 interagiert mit zwei weiteren Proteinen: I κ B α und p105.

Tabelle 2: Interaktion der Bcl-3-interagierenden Partner mit Proteine, die verwandte Ankyrin-Repeats enthalten(β -Gal Aktivität in arbitrary units)

Kandidat	Bcl-3	I κ B α	I κ B β	I κ B γ	Tan1-ARD	Tan1-3-7ARD	Bard1-ARD
leerer Vector	<1	7 \pm 1	<1	<1	5 \pm 1	<1	<1
Pirin	72 \pm 6	29 \pm 3	<1	3 \pm 1	4 \pm 1	<1	<1
Tip60	10 \pm 1	5 \pm 1	2 \pm 1	3 \pm 1	35 \pm 3	<1	<1
Jab	7 \pm 1	6 \pm 1	<1	29 \pm 2	6 \pm 2	<1	<1
Bard	12 \pm 1	80 \pm 4	<1	71 \pm 4	4 \pm 1	<1	<1
Skip	42 \pm 5	30 \pm 2	12 \pm	112 \pm 8	10 \pm 2	8 \pm 1	<1
Trip4	48 \pm 4	22 \pm 2	8 \pm	42 \pm 2	11 \pm 2	7 \pm 2	<1
p50	64 \pm 4	5 \pm 1	<1	74 \pm 6	Nicht durchgeführt	<1	<1
p52	++	Nicht durchgeführt	-	+	Nicht durchgeführt	-	-

2.1.3.4 Deletionsmutationen in den Bcl-3-Ankyrin-Repeats und der Einfluß auf das Interaktionsverhalten im Yeast-Two-Hybrid-System

Als nächstes haben wir untersucht, ob die gesamte Struktur der Ankyrin-Repeats von Bcl-3 nötig ist, um an die Interaktionspartner im Yeast-Two-Hybrid-System zu binden. Dazu haben wir mehrere Deletionsmutanten von Bcl-3 hergestellt, in denen alle sieben bzw. fünf, vier oder drei der Ankyrin-Repeats an die Gal-4-DNA-bindende Domäne fusioniert wurden. p50 und Tip60 benötigen die komplette Struktur der Bcl-3 Ankyrin-Repeats für eine Interaktion. Jab1 und Bard1 interagieren ebenfalls mit fünf Ankyrin-Repeats, Trip4 und Skip ebenfalls mit vier Ankyrin Repeats von Bcl-3. Konstrukte, die aus weniger als vier Konstrukte bestehen, interagieren mit keinem der Bindungspartner (Tabelle 3).

Tabelle 3: Deletionsmutanten von Bcl-3 und ihre Fähigkeit, mit den Interaktionspartnern im Yeast–Two-Hybrid-System zu interagieren

	PIRIN	TIP60	JAB1	BARD1	SKIP	TRIP4	p50
Bcl-3 ARD 1-7	+++	++	++	++	+++	+++	+++
Bcl-3 ARD 1-5	-	-	++	+	+++	+++	-
Bcl-3 ARD1-4	-	-	-	-	++	++	-
Bcl-3 AA 1-3	-	-	-	-	-	-	-

2.1.3.5 Überprüfung der Bcl-3-Interaktionen

Zunächst wurde ein β -Galaktosidase-Test in Flüssigkultur mit o-NPG zur Bestätigung und Quantifizierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen exprimiertem Köderprotein und isoliertem Beuteprotein durchgeführt. Dazu wurden die Köderproteine gemeinsam mit dem leeren pGBT9, laminin-pGBT9, Bcl-3 (120-359)-pGBT9 und die Ankyrin-Repeats von p105-pGBT9 co-transformiert. Dabei ließen sich die Interaktionspartner in drei Gruppen einteilen: stark (>50 β -GalU), mittelstark (15-50 β -GalU) und schwach interagierende Partner (5-15 β -GalU). Zudem zeigte dieses Experiment, dass bis auf Pirin und Tip60 die übrigen Klone ebenfalls mit den Ankyrin-Repeats von p105-pGBT9 interagierten.

Tabelle 4: Reporter-Test mit Bcl-3-interagierenden Klonen, unterteilt nach stark, mittelstark und schwach interagierenden Partnern.

stark interagierende Partner (>50 β -GalU)

Interaktionspartner	Bcl3-pGBT9 (lacZ Aktivität)	Ankyrin-p105-pGBT9 (lacZ Aktivität)	laminin-pGBT9 (lacZ Aktivität)	pGBT9 (lacZ Aktivität)
Pirin	65	10	1	1
Skip	52	167	1	1
Trip4	55	105	5	2

mittelstark interagierende Partner (15-50 β -GalU)

Interaktionspartner	Bcl3-pGBT9 (lacZ Aktivität)	Ankyrin-p105-pGBT9 (lacZ Aktivität)	laminin-pGBT9 (lacZ Aktivität)	pGBT9 (lacZ Aktivität)
Bard	16	71	2	0
p50	13	2	1	1

schwach interagierende Partner (5-15 β -GalU)

Interaktionspartner	Bcl3-pGBT9 (lacZ Aktivität)	Ankyrin-p105-pGBT9 (lacZ Aktivität)	laminin-pGBT9 (lacZ Aktivität)	pGBT9 (lacZ Aktivität)
Klon 2	7	4	1	1
Klon3	6	15	1	1
Jab	7	29	2	1
Tip60	10	3	1	1

Als nächstes wurden die c-DNAs der verschiedenen Klone mit einem flag-Epitop in Leserichtung in einen Expressionsvektor umklontiert und in Retikulozytenlysate mit radioaktiv markiertem Methionin in vitro translatiert (Abbildung 4). Bcl-3 (120-359) und die Ankyrin-Repeats von p105 wurden als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und an GST-Beads gekoppelt. Die Interaktion mit Bcl-3 konnte mittels GST-Fusionsproteinen bestätigt werden.

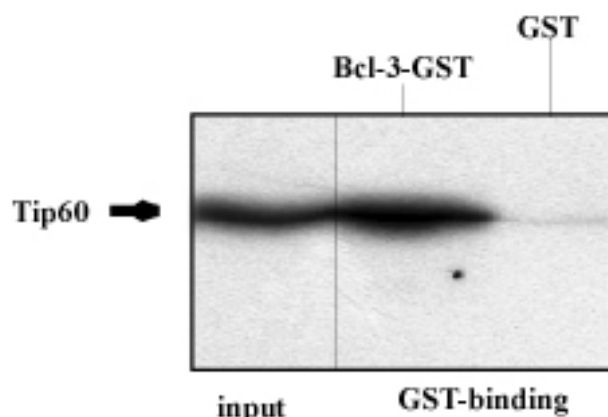
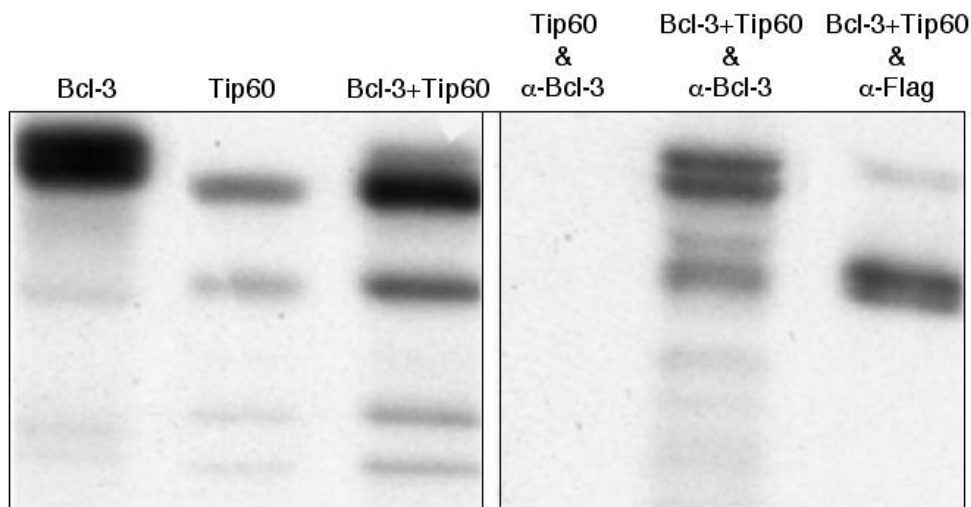


Abbildung 4: Beispiel eines GST-Pulldown-Tests

Neben der GST-Fusionsmethode wurde versucht, mittels Co-Immunopräzipitation die Protein-Protein-Interaktionen zu verifizieren (Abbildung 5). Nach in vitro-Translation der cDNAs der potentiellen Interaktionspartner sowie des Köderproteins Bcl-3 in Retikulozytenlysate mit radioaktiv markiertem Methionin, wurde die Co-Immunopräzipitation beider Proteine jeweils mit einem polyklonalen Bcl-3-Antikörper

(gegen die N-terminale Region) und mit einem monoklonalen Anti-Flag Antikörper durchgeführt.



in-vitro Translation

Co-Immunopräzipitation

Abbildung 5: Beispiel einer Co-Immunopräzipitation in vitro nach Translation (Tip 60 mit Bcl-3)

Nachdem wir eine Interaktion zwischen Bcl-3 und den interagierenden Klonen in vitro und in Hefen nachgewiesen hatten, wollten wir untersuchen, ob diese Interaktion auch in höheren eukaryontischen Zellen in vivo nachzuweisen ist. Da für keinen der interagierenden Klone Antikörper vorhanden sind, entschlossen wir uns, diesen Versuch mit „getaggten“ Proteinen durchzuführen (Abbildung 6). Bcl-3, mit einem G0-Epitop-Tag versehen, und die interagierenden Klone, mit einem Flag-tag versehen, wurden mittels Calciumphosphat Transfektion in die humane Nierenkarzinom-Zell-Linie 293 transfiziert. Sechsenddreißig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und in einen Lysepuffer überführt. Nachdem der Lysepuffer 1:3 verdünnt wurde, erfolgte eine Immunopräzipitation mit einem monoklonalen G0-Antikörper. Die Präzipitate wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und auf einem 12%-SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Nach Elektrophoretik auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels monoklonalem Anti-Flag-Antikörper. Die GST-Pulldown-Tests sowie die in vitro und in vivo Co-Immunopräzipitation der einzelnen Klone sind in Paper P1

abgebildet. Exemplarisch ist die Co-Immunopräzipitation zwischen Tip60 und Bcl-3 in Abbildung 6 dargestellt.

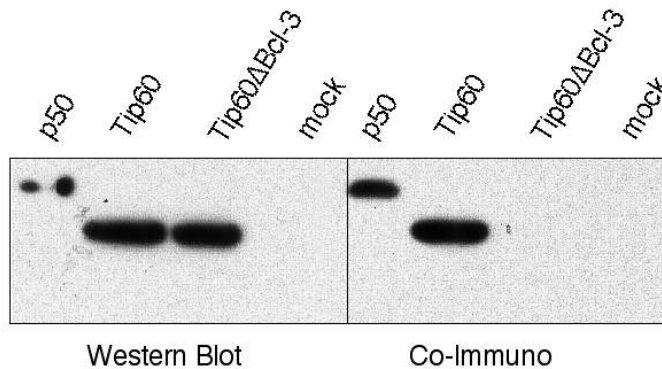


Abbildung 6: Beispiel einer Co-Immunopräzipitation in vivo nach Transfektion mit Tip 60 und Bcl-3.

2.1.3.6 Bandshiftanalyse von Bcl-3 und interagierenden Klonen

Die Interaktion von an DNA gefundenem p50 mit Bcl-3 hängt von den gewählten experimentellen Bedingungen ab. In der Literatur werden sowohl ternäre Komplexe beschrieben als auch eine Inhibierung der p50-DNA-Interaktion. Um den Einfluss der interagierenden Klone zu untersuchen, wählten wir Bedingungen, bei denen die Zugabe von Bcl-3 zu DNA gebundenem p50 zu der stabilen Formation eines ternären Komplexes führt. Die Untersuchungen wurden in vitro entweder an GST-Fusionsproteinen oder translatierten Proteinen durchgeführt. Zugabe von Tip60, Bard1 und Pirin führten zur Ausbildung eines quartären Komplexes, bestehend aus DNA, p50, Bcl-3 und den interagierenden Klonen (Abbildung 7). Trip4, Skip und Jab1 konnten allerdings keinen Supershift erzeugen. Jab1 und Pirin erhöhten weiterhin noch die DNA-bindende Aktivität (Abbildung 8). Diese Daten zeigen, dass Bcl-3 in vitro quartäre Komplexe bilden kann, in die jeweils Pirin, Tip60 und Bard1 involviert sind.

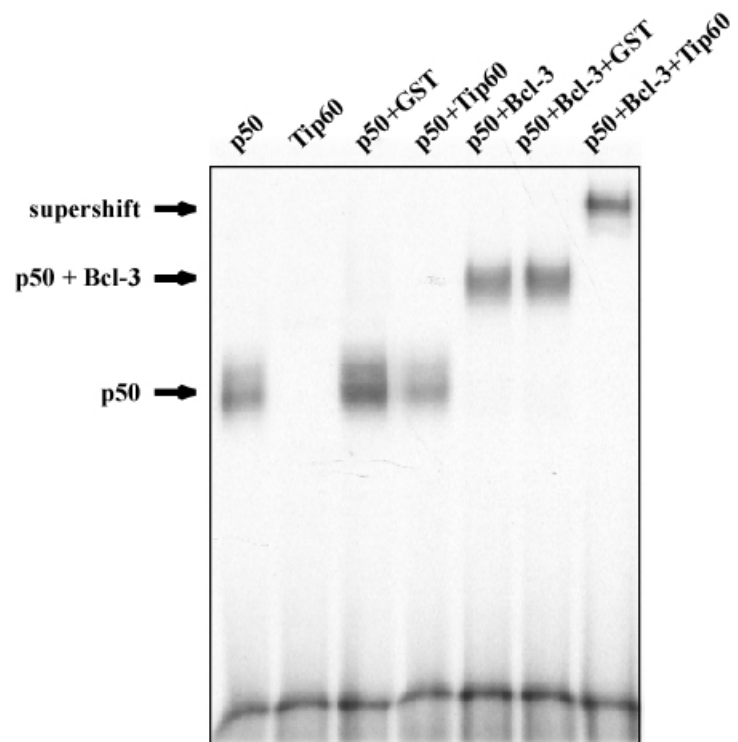


Abbildung 7: NF-κB-Aktivität, quartärer Komplex aus DNA, p50, Bcl-3 und Tip60

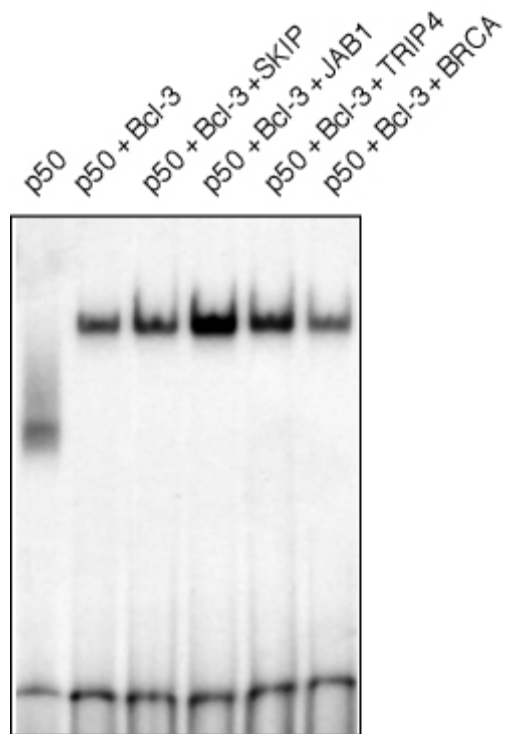


Abbildung 8: Modulation der NF-κB durch die Interaktionspartner

2.1.3.7 Einfluß der Interaktionspartner auf die endogene NF- κ B-Aktivität

Um zu untersuchen, ob die interagierenden Klone die DNA-bindende Aktivität von p50/Bcl-3 in vivo analysieren, testeten wir die Interaktionspartner in einem System, welches von Vigo Heißmeier im Labor von Claus Scheidereit etabliert wurde. In eine Zell-Linie, die stabil Bcl-3 überexprimiert, wurden die Interaktionspartner mittels Calciumphosphat transfiziert. Die DNA-bindende Aktivität von NF- κ B ist durch die Transfektion der Interaktionspartner nicht beeinflusst. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation mit einem Anti-Bcl-3-Antikörper durchgeführt, der gegen das C-terminale Ende von Bcl-3 gerichtet ist. Die immunopräzipitierten Komplexe wurden mittels des Detergenz DOC dissoziiert und erneut mittels Bandshiftanalyse untersucht. Wie zu erwarten, ist nach Immunopräzipitation mit Bcl-3, keine p50/p65 Aktivität nachweisbar. Doch führte die Transfektion von mehreren Interaktionspartnern zu einer Steigerung der endogenen p50/p50-DNA-bindenden Aktivität. Diese Aktivierung ist am stärksten durch das Hinzugeben von Jab1, gefolgt von Trip4, Tip60 und Skip. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Interaktionspartner die endogene Aktivität von p50-Homodimeren verstärken (Abbildung 9)..

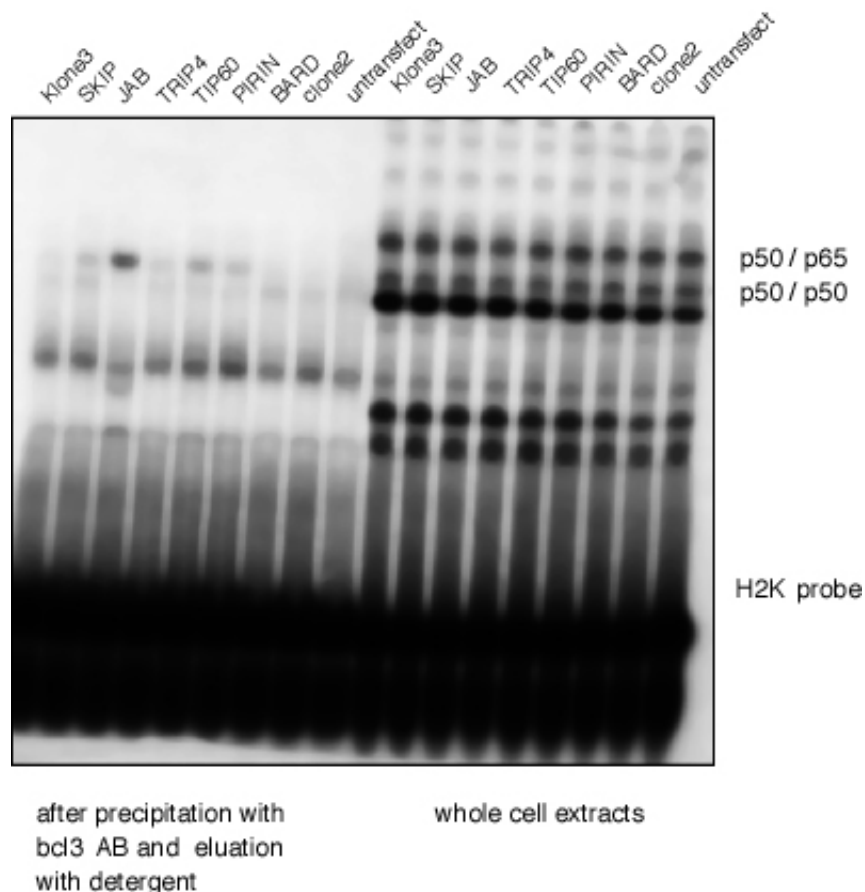


Abbildung 9: endogene NF- κ B-Aktivität: Gel-shift-Analyse der Extrakte zeigt vergleichbare NF- κ B/Rel-DNA-Bindungsaktivität (rechts). Wie erwartet, war nach Präzipitation keine p50/p65 Aktivität nachweisbar. In der mock-transfizierten Gruppe konnte lediglich eine schwache p50/p50-Aktivität nachgewiesen werden. Die Expression von Jab1, Trip4, Tip60 und Skip führte zu einem starken Anstieg der Bcl-3-assoziierten p50/p50-Aktivität.

2.1.3.8 Transiente Transfektionen und Reporterogenaktivitäten

Als nächstes wollten wir untersuchen, ob die neuen Interaktionspartner die Transkriptionsaktivität von Bcl-3 modulieren. Dazu haben wir transiente Transfektionen und Reporterassays in verschiedenen Zell-Linien (Schneider Zellen, QT6 und HD3) durchgeführt. Als Reporterplasmide benutzten wir den HIV-Reporter und den P-Selektin Promoter, welcher an das Luciferasegen gekoppelt wurde. Von beiden Plasmiden verwendeten wir auch Versionen, in denen durch eine Punktmutation die NF- κ B-Bindestelle zerstört wurde. Von dem cis-regulatorischen NF- κ B-Element im P-Selektin-Promoter ist bekannt, dass es von p50 und p52 gebunden wird, und dass dieser Promoter durch p50 und Bcl-3 um den Faktor 3-4 aktiviert wird. Durch Zugabe von Tip60 kommt es zu einer verstärkten Aktivierung, so

dass wir in der höchsten Dosierung von Tip60 eine ca. 11-fache Aktivierung des Reporters gesehen haben (Abbildung 10). Eine Mutation in der NF- κ B Bindungsstelle des P-Selektin-Promoters verhindert die Aktivierung durch Bcl-3 und Tip 60 (Abbildung 11). Bestimmte Konzentrationen von Bcl-3 und Jab1 führen zu einer 5-fachen Aktivierung.

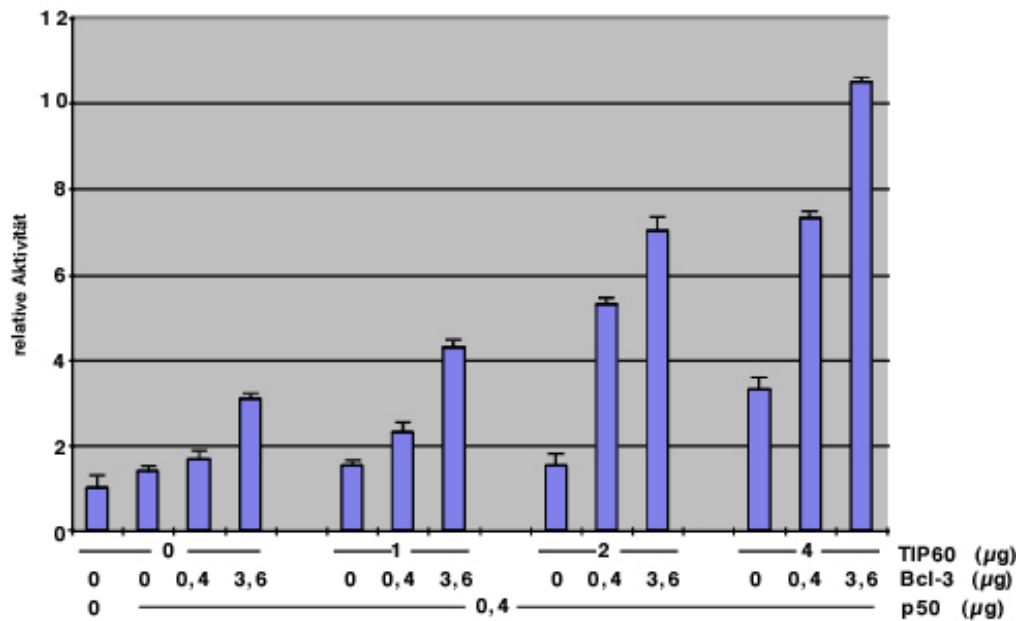


Abbildung 10: Transiente Transfektionen und Reporter-Gen-Assays mit dem P-Selektin-Promoter

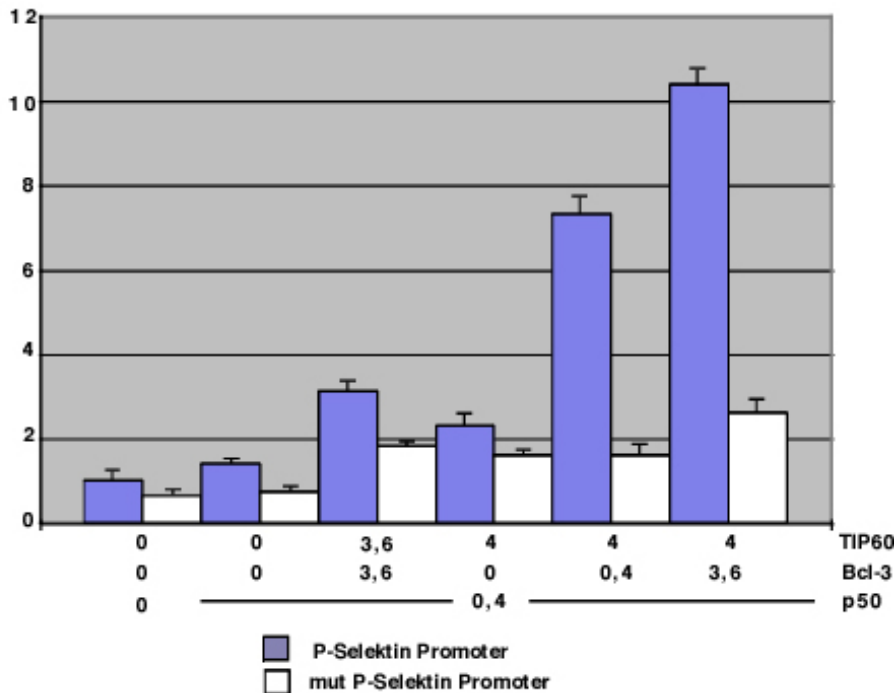


Abbildung 11: Transiente Transfektionen und Reporter-Gen-Assays mit dem P-Selektin Promoter, dessen NF- κ B Bindungsstelle durch eine Punktmutation modifiziert wurde.

In diesem System führen zwei der gefundenen Interaktionspartner, Tip60 und Jab1, zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität von Bcl-3. Der Effekt von Tip60 ist abhängig von der Intaktheit der NF- κ B Bindungsstelle. Im gleichen Testsystem haben wir bereits publiziert, dass es zu einer funktionellen Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF- κ B, die ebenfalls von der intakten NF- κ B Bindungsstelle des P-Selektin-Promoters abhängt (Abbildung 12). Wir konnten zeigen, dass Sp1 zu einer starken Aktivierung des P-Selektin-Promoters führt (A). Eine Mutation in der NF- κ B Bindungsstelle reduziert die ca. 50-fache Aktivierung auf den Faktor 10 (B). Der gleiche Effekt ereignet sich, wenn p50 zu dem System gegeben wird (C). Bcl-3, in Kombination mit p50 und Sp1, führt erneut zu einer 50-fachen Aktivierung. In diesem System haben wir die Interaktionspartner getestet. Tip60 führt in dem System mit Sp1, p50 und Bcl-3 bereits in geringer Konzentration zu einer Repression auf den Basiswert. Den gleichen Effekt haben Bard1 und Jab1, jedoch erst in höheren Konzentrationen. Das Modell für die Interaktion der Transkriptionsfaktoren ist in Abbildung 13 dargestellt.

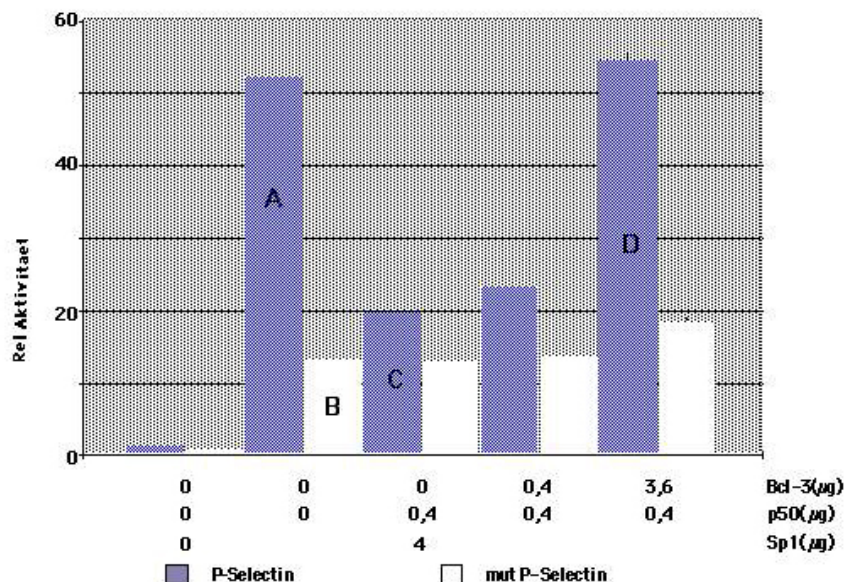


Abbildung 12: Aktivierung des P-Selektin-Promoters

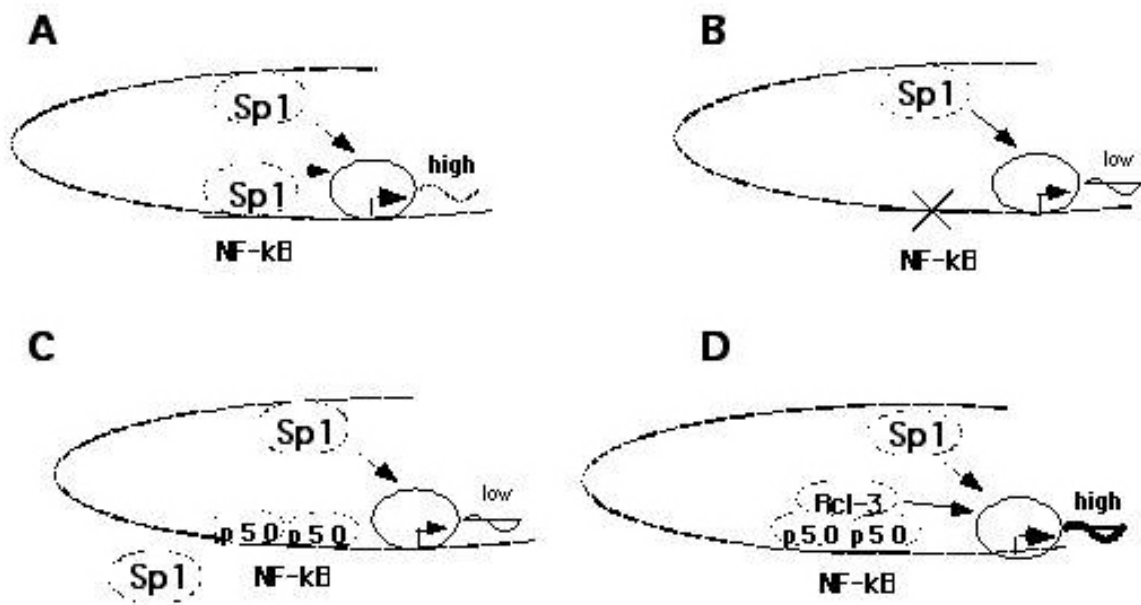


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen p50, Bcl-3, SP-1 und Interaktionspartnern

2.1.3.9 Reprint Paper 1:

Dechend R, Hirano F, Lehmann, Vigo Heissmeyer V, Ansieau S,
Wulczyn FG, Scheidereit C, Leutz A

The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between
NF-kB/Rel and nuclear co-regulators

Oncogene 1999;18:3316-23

2.1.4 Diskussion und Ausblick

Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems haben wir fünf neue Proteine identifiziert, die mit Bcl-3 interagieren. Alle fünf Proteine sind nukleäre Proteine. Obwohl wir kein gemeinsames strukturelles Motiv unter diesen fünf Proteinen gefunden haben, verbindet sie die gemeinsame Funktion. Alle fünf sind in die Genregulations- und Transkriptionskontrolle involviert. Alle Interaktionspartner bilden binäre Komplexe in vitro (Co-Immunopräzipitation und GST-Pulldown) und im Yeast-Two-Hybrid-System, wobei die Interaktionspartner wahrscheinlich verschiedene strukturelle Motive in den Ankyrin-Repeats von Bcl-3 und I κ B Proteinen erkennen. Bard1, Pirin und Tip60 bilden quartäre Komplexe mit p50, Bcl-3 und einer NF- κ B Bindungsstelle. In diesen Experimenten können wir zeigen, dass Bcl-3 mit den Ankyrin-Repeats zur gleichen Zeit mit (mindestens) zwei Proteinen interagieren kann (Abbildung 14). Die endogene Aktivität von p50/Bcl-3 Komplexen wird durch die Transfektion der Interaktionspartner gesteigert. Den größten Effekt hat dabei Jab1. In transienten Transfektionen modulieren Jab1, Tip60, Bard1 und Pirin die Transkriptionsaktivität von Bcl-3 in verschiedenen Zell-Linien und mit verschiedenen Reporterkonstrukten. Den stärksten aktivierenden Effekt auf p50/Bcl-3 übt Tip60 aus. Tip60, Jab1 und Pirin können ebenfalls in vivo mit Bcl-3 co-immunopräzipitiert werden, wenn beide Proteine transient transfiziert werden.

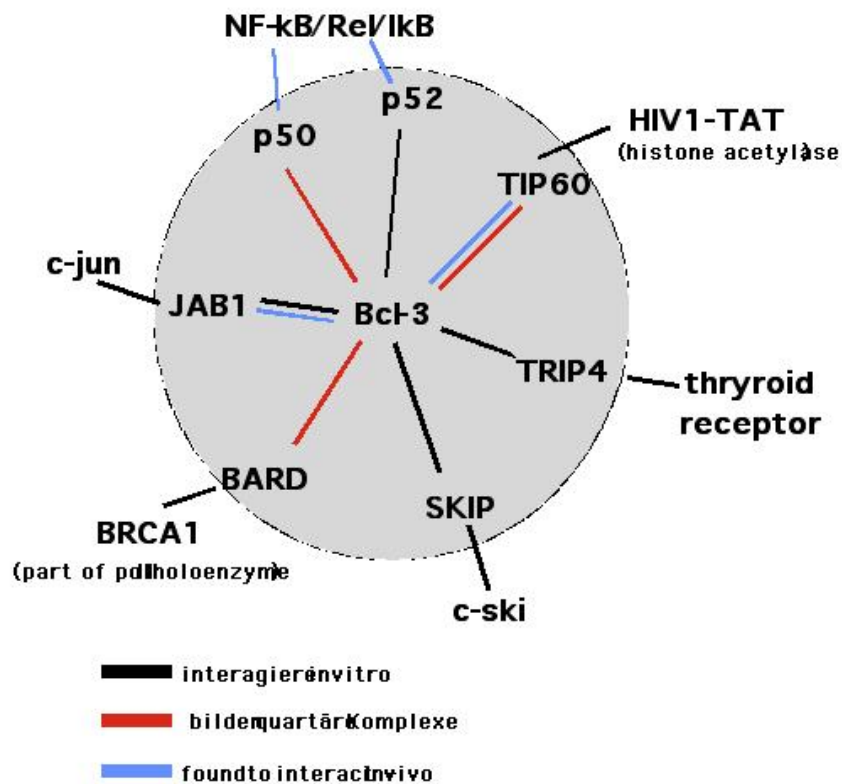


Abbildung 14: schematische Darstellung der Bindung zwischen Bcl-3 und Interaktionspartnern

Auf Grund dieser Ergebnisse spekulieren wir, dass Bcl-3 eine Adapterfunktion ausübt, die NF-κB-p50/p52 mit anderen Transkriptionsfaktoren (NF-1, c-jun, Schilddrüsen-Rezeptor, HIV-Tat) bzw. basalen Transkriptionsfaktoren (Histonacetylasen, RNA Polymerasen) verbindet. Abbildung 15 fasst diese Adapterfunktionen zusammen. In diesem Zusammenhang ist auch ein Zusammenwirken dieser Proteine in der Regulation von verschiedenen Genen vorstellen, was schematisch in Abbildung 15 dargestellt ist. Gen 1 wird reguliert durch einen Multikomplex, der aus p50, Bcl-3, Bard1, BRCA und der basalen Transkriptionsmaschinerie besteht. Gen 2 wird z.B. durch einem Multikomplex reguliert, der aus p50, Bcl-3, Tip60, TAT und TAR besteht. Gen 3 wird durch einen Komplex, der p50, Bcl-3, Jab1 und AP1 enthält, in seiner Aktivität bestimmt. Ebenso sind Multikomplexe vorstellbar, die zwar durch Bcl-3, jedoch unabhängig von NF-κB

reguliert werden. Dieses ist schematisch in Gen 4 dargestellt. Hier besteht der hypothetische Regulationskomplex aus AP-1, Jab1, Bcl-3, Bard1, BRCA und der basalen Transkriptionsmaschinerie.

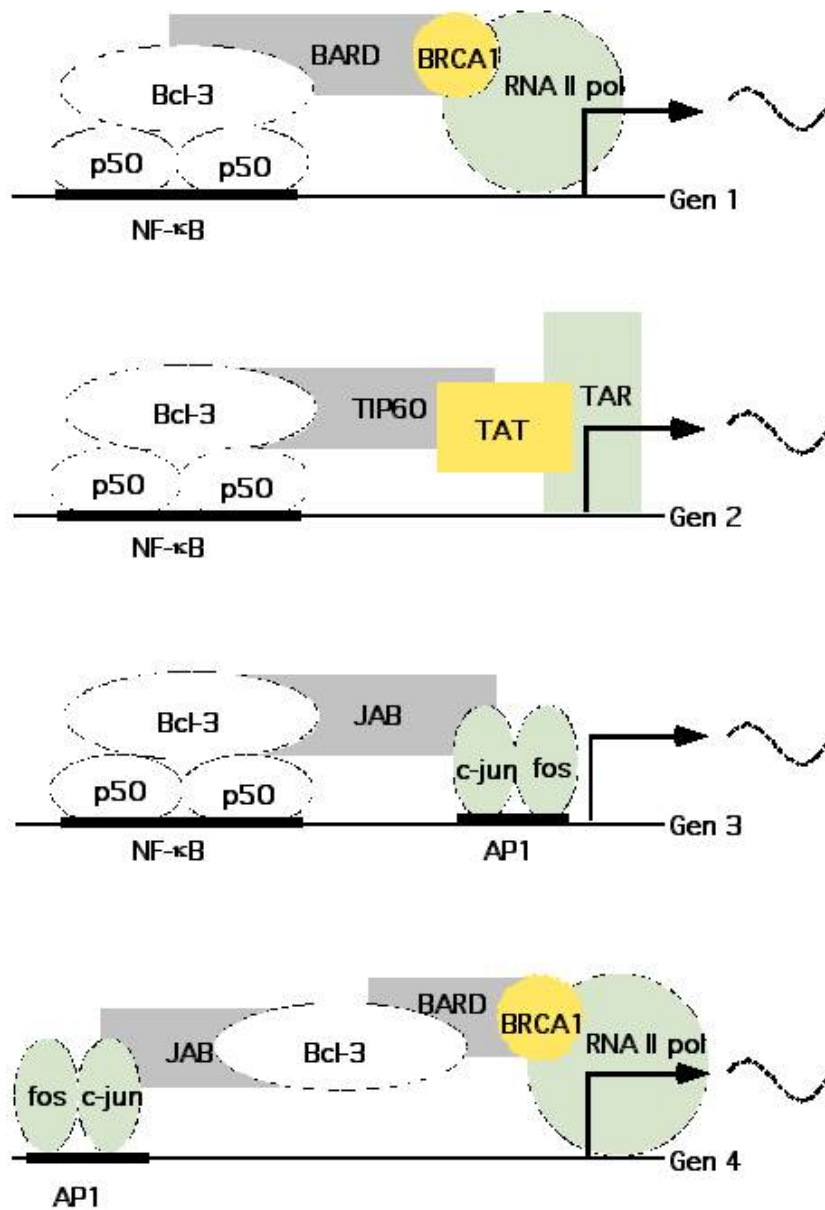


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren über Bcl-3 und die Interaktionspartner

2.2 Projekt 2: Infektion von Chlamydia pneumoniae und NF-κB-Aktivierung in Zellen der Gefäßwand

2.2.1 Einleitung

Neben den etablierten Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung gibt es Hinweise, dass ein infektiöses Agens ursächlich an der Pathogenese und Progredienz der Arteriosklerose beteiligt ist.¹²¹ Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass unter den möglichen Erregern *Chlamydia pneumoniae* das infektiöse Agens sein könnte.¹²² *C.pneumoniae* ist ein obligat intrazellulärer Organismus und ein Bakterium, welches häufig bronchopulmonale Infekte hervorruft. Im Alter von 50 Jahren haben 50% der Bevölkerung positive Antikörper gegen *C.pneumoniae*, was für eine stattgehabte Infektion spricht.¹²³ Neueste Untersuchungen haben eine *C.pneumoniae*-Infektion mit ischämischem Schlaganfall, Myokardinfarkt und Arteriosklerose assoziiert.¹²⁴ Ein Anstieg des Titers gegen *C.pneumoniae*-Antikörper ist in 60% von Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachgewiesen worden. Die Assoziation von vorheriger *C.pneumoniae*-Infektion und Arteriosklerose der Koronar- bzw. der Carotidarterien ist durch mehrere unabhängige epidemiologische Untersuchungen gezeigt worden.^{125,126} Das Vorhandensein von *C.pneumoniae* in arteriosklerotischen Gefäßen ist mittels Immunohistochemie, Elektronenmikroskopie und mittels verschiedener DNA-Amplifikationstechniken nachgewiesen worden.¹²⁷⁻¹²⁹ In arteriosklerotischen Koronararterien, gewonnen aus Atherektomien, konnte zu 79 % die Präsenz von *C.pneumoniae* nachgewiesen werden, während in lediglich 4 % von nicht-arteriosklerotischen Arterien *C.pneumoniae* vorhanden war. In dieser Studie konnte *C.pneumoniae* in Makrophagen, Endothel und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden.¹³⁰ Eine weitere immunohistochemische Studie an Autopsiegewebe konnte zeigen, dass *C.pneumoniae* signifikant häufiger in kardiovaskulärem Gewebe nachweisbar ist als in anderen Geweben. Wenn es jedoch in nicht kardiovaskulärem Gewebe nachweisbar war, war es auch in kardiovaskulärem Gewebe vorhanden. Daraus

folgern die Autoren, dass *C.pneumoniae* eine Präferenz für kardiovaskuläres Gewebe besitzt.¹³¹ Tierexperimentelle Untersuchungen, in denen Kaninchen mit einer Cholesterin-reichen Diät gefüttert wurden, zeigten, dass durch *C.pneumoniae* eine beschleunigte arteriosklerotische Reaktion in den Gefäßen hervorgerufen wurde. Diese konnte erfolgreich durch Makrolidantibiotika verhindert werden.^{132,133} Vorläufige Ergebnisse aus Interventionsstudien an Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die zusätzlich mit Makrolidantibiotika therapiert wurden, zeigen ebenfalls positive Ergebnisse, so dass die Hypothese einer kausalen Genese der *C.pneumoniae*- Infektion gestützt wird.^{134,135}

Das 1986 bei respiratorischen Infekten beschriebene Bakterium *C. pneumoniae* wurde als bisher einziger Erreger direkt aus arteriosklerotischen Plaques isoliert.¹³⁶ Grund für die späte Entdeckung waren Schwierigkeiten, den obligat intrazellulären Erreger anzuzüchten. Es gibt nur ca. 70 lebensfähige Stämme und wenige Labore, die Primärisolationen vornehmen. Trotz der wenigen Isolate ist die Durchseuchung hoch: praktisch jeder Mensch infiziert sich mit dem Erreger.¹³⁷ Da Chlamydien im Gewebe persistieren können, stellte sich die Frage nach den Konsequenzen einer so häufigen Infektion.¹³⁸ Serologische Untersuchungen belegten dann die *C. pneumoniae*-Infektion als Risikofaktor der Arteriosklerose, konnten aber wegen des indirekten statistischen Ansatzes keine Kausalität beweisen.¹³⁸

2.2.2 Fragestellung

Die Fragestellung der ersten Arbeit war, ob durch eine Infektion mit *C.pneumoniae* in der Gefäßwand das „lokale Milieu“ so verändert wird, dass ein akutes Koronarsyndrom ausgelöst oder unterhalten wird. Dabei sollte untersucht werden, ob durch *C.pneumoniae* die intrazelluläre Signaltransduktion so verändert wird, dass eine vermehrte Thrombogenität und Entzündung an Endothel- und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden kann. Als wichtigstes intrazelluläres Protein, welches eine Entzündungsreaktion und Thrombogenität einleiten kann, haben wir den Transkriptionsfaktor NF-κB untersucht.

In der zweiten Arbeit war die Fragestellung, ob *C.pneumoniae*-infizierte glatte Muskelzellen (VSMC) derart aktiviert werden, dass sie Makrophagen oder T-Lymphozyten stimulieren, so dass der „cross-talk“ zwischen VSMC und Entzündungszellen aktiviert wird. Zudem haben wir untersucht, ob *C.pneumoniae* infizierte Makrophagen den Erreger in einer Art „lokalen Infektion“ an VSMC weitergeben können. Weiterhin wollten wir untersuchen, ob HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren einen inhibitorischen Einfluß auf die aktivierenden Signaltransduktionswege nach *C.pneumoniae*-Infektion haben. Dabei hat uns insbesondere die Prenylierung der Rho Familie interessiert. Entscheidend bei diesen Zellkulturarbeiten war, dass wir möglichst physiologische Situationen imitiert haben. Wir haben primäre humane VSMC und *C.pneumoniae*-Erreger verwendet, die aus humanen arteriosklerotischen Plaques isoliert wurden. Zudem ist die Konzentration der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren so gewählt worden, wie sie bei Patienten in therapeutisch relevanten Dosierungen vorkommt.

In der 1. Arbeit des vorliegenden Teilprojekts wurden die folgenden Aufgaben bearbeitet:

- Infektion von primären humanen Endothel- (EC) und glatten Muskelzellen (VSMC) mit *C.pneumoniae*
- Identifikation von Signaltransduktionswegen EC und VSMC nach *C.pneumoniae* Infektion, insbesondere eine Aktivierung von NF- κ B und die Expression des Inhibitors I κ B α .
- Intra- und extrazelluläre Expression von Interleukin-6 und PAI-1 nach *C.pneumoniae*-Infektion
- Aktivität und Expression von Tissue Faktor nach *C.pneumoniae* Infektion

In der 2. Arbeit des vorliegenden Teilprojekts wurden die folgenden Aufgaben bearbeitet:

- Mechanismen der lokalen Infektion in der Gefäßwand: Übertragung von *C.pneumoniae*-infizierten Makrophagen auf VSMC und der Einfluß von HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren
- Intra- und extrazelluläre Expression von $\text{TNF}\alpha$, Rantes, MCP-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 und der Einfluß von HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren nach *C.pneumoniae*-Infektion
- Detaillierte Untersuchung zur Signaltransduktion in VSMC nach *C.pneumoniae* Infektion: Membranständige Expression und Aktivität von RhoA und Rac1 und der Einfluss von HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren. Evaluierung der Bedeutung dieser beiden Signaltransduktionswege durch spezifische Inhibitoren und VSMC von „knock-out“-Tieren.
- Die intrazelluläre Entstehung von Sauerstoffradikalen in glatten Muskelzellen nach *C.pneumoniae*-Infektion

2.2.3 Ergebnisse

2.2.3.1 Reprint Paper 2

Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, Gulba DC
 Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells
 activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression : A potential link
 to accelerated arteriosclerosis.
 Circulation 1999;100:1369-73

2.2.3.2 Signaltransduktion in glatten Muskelzellen nach Infektion mit

C. pneumoniae

Als wichtigstes Regulatorprotein in Entzündungsreaktionen hat sich der Transkriptionsfaktor NF- κ B herauskristallisiert. Er aktiviert die wichtigsten Gene, die wir als Mediatoren einer Entzündungsreaktion kennen, wie z.B. TNF α , Chemokine (IL-1, IL-6, IL-8), Adhäsionsmoleküle (Selektine, VCAM-1, ICAM-1) und Gerinnungsfaktoren (Tissue Faktor, PAI-1). Weiterhin gibt es Hinweise, dass NF- κ B an Wachstums- und Tumorzellen sowie an der Apoptoseregulation beteiligt ist. Die Aktivierung von NF- κ B nach *C.pneumoniae*-Infektion beginnt in unseren Untersuchungen nach 4 Stunden und ist auch nach 72 Stunden noch nachweisbar (siehe Reprint P2).

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren haben gezeigt, dass sie die Plaque-Progression an Koronar- und Carotidarterien verlangsamen und dass sie die Restenoserate sowohl in Tiermodellen als auch an Patienten reduzieren. Diese so genannte Plaquepassivierung hat in einer kürzlich publizierten Studie ähnlich gute Erfolge gebracht wie eine durchgeführte Koronarangioplastie. Eine Sekundärprävention mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren hat die Sterblichkeit signifikant gesenkt. Aus der Analyse sämtlicher Daten geht hervor, dass die etablierte Wirkung auf das Cholesterin nicht der alleinige Mechanismus für den positiven Effekt der Statine ist. Als mögliche Mechanismen werden protektive Einflüsse auf das Endothel und die glatten Muskelzellen diskutiert, an der auch eine anti-inflammatorische Komponente beteiligt sein könnte.

Die Hypothese der weiteren Untersuchungen lautet: Die durch *Chlamydia pneumoniae* hervorgerufene chronische Entzündungsreaktion in humanen Gefäßmuskelzellen führt zu einer Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten. Es soll untersucht werden ob beide Prozesse durch NF- κ B und RhoA/Rac1 reguliert werden. Wir wollen testen, ob durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die *Chlamydia pneumoniae*-induzierte NF- κ B-Aktivierung bzw. die durch NF- κ B vermittelten Prozesse inhibiert werden können.

Abbildung 16 zeigt einen Elektro-Mobility Shift Assay für NF- κ B 24 h nach Infektion mit *C.pneumoniae*. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nach *C.pneumoniae*-Infektion (Spur 5) gegenüber Mock-Infektion. Eine Therapie mit dem Antibiotikum Moxifloxacin (Spur 2) reduzierte die NF- κ B-Aktivität auf den Leerwert. Einen ähnlichen Einfluß hatte eine Infektion mit abgetöteten *C.pneumoniae*. Die NF- κ B-Aktivität in glatten Muskelzellen ist deutlich abgeschwächt. Eine Vorinkubation mit dem HMG-CoA-Reduktaseinhibitor Cerivastatin reduzierte die NF- κ B-Aktivität ebenfalls deutlich.

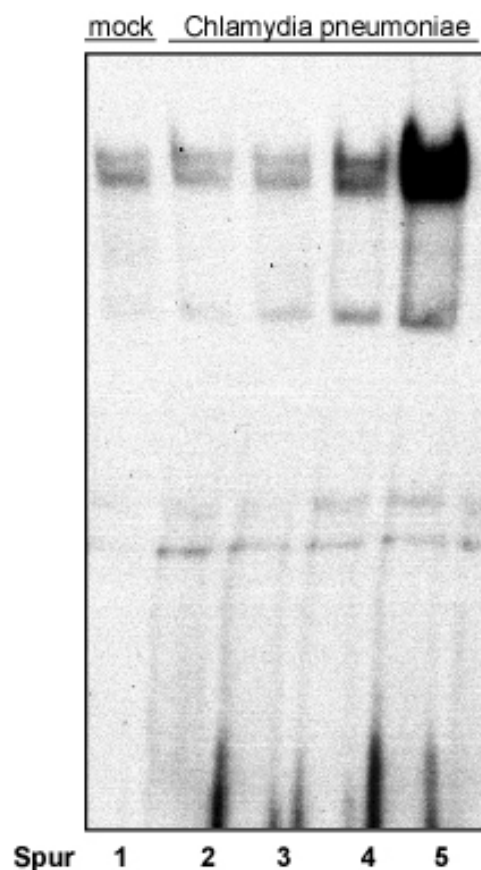


Abbildung 16: NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nach Mock Infektion (Spur 1) und 24h nach *C.pneumoniae*-Infektion (Spur 2-5) im EMSA. Antibiotische Therapie mit Moxifloxacin (Spur 2), Infektion mit abgetöteten *C.pneumoniae*-Erregern (Spur 3) und Vorinkubation mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Cerivastatin reduzieren die NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Infektion mit *C.pneumoniae* (Spur 5)

In Abbildung 17 konnten wir zeigen, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) im Zeitverlauf die NF- κ B-Aktivität nach *C.pneumoniae*-Infektion reduzierten (linke

Abbildung). Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Statine ist dosisabhängig. Ab einer Konzentration von 10 μ g/ml von Cerivastatin ist eine NF- κ B-Hemmung nachweisbar (mittlere Abbildung). Die Plasmakonzentration in Patienten, die Cerivastatin 0,4 erhalten, beträgt ungefähr 50 μ g/ml, so dass die beobachteten Effekte klinisch relevant sein könnten. Supershift-Analysen mit Antikörper gegen p50 und p65 zeigen, dass der durchgeführte EMSA spezifisch ist und dass p50 und p65 die aktiven Komponenten der NF- κ B-Familie sind (rechte Abbildung). Zudem konnten die spezifischen Banden durch einen 50-fachen Überschuß an nicht radioaktiv markierten Oligonukleotiden kompetiert werden.

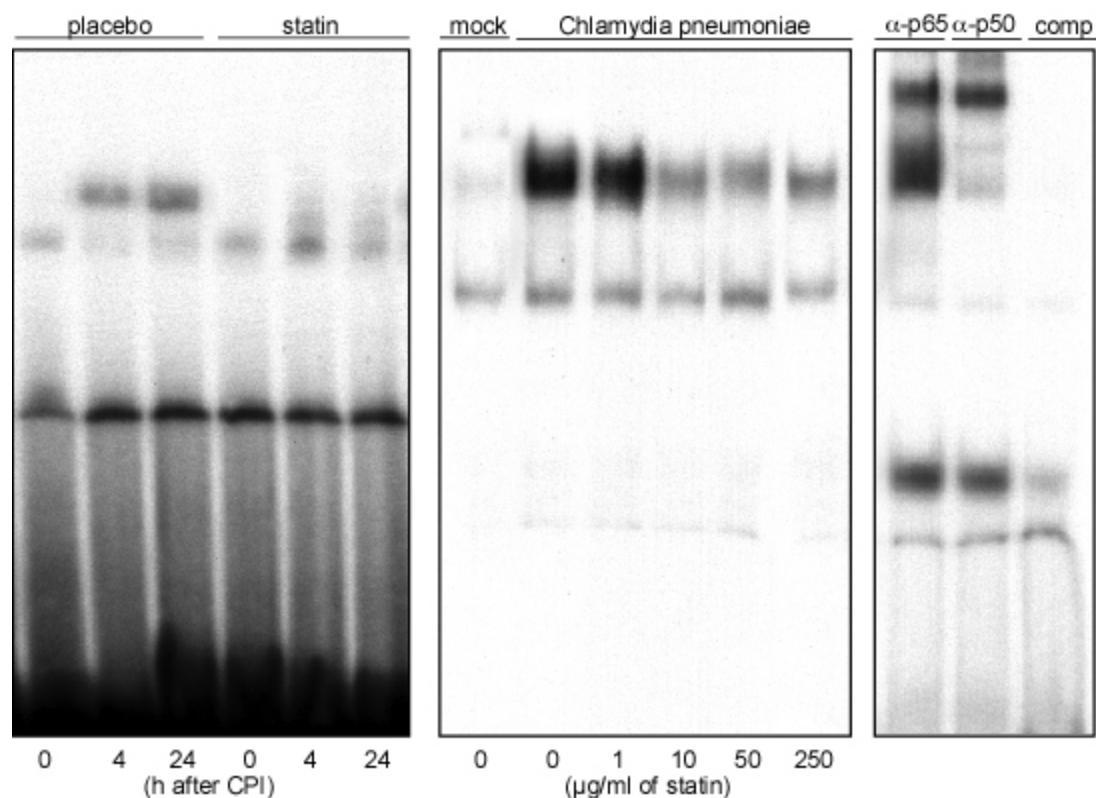


Abbildung 17: (linke Abbildung) Zeitverlauf der NF- κ B-Aktivität nach *C.pneumoniae* nach Vorinkubation mit Statin und Placebo. Der Effekt der Statine auf die NF- κ B-Aktivität ist dosisabhängig (mittlere Abbildung). Supershift und Kompetition der NF- κ B-Aktivität (rechte Abbildung).

Die Expression des Inhibitors I κ B α wird nach Infektion mit *C.pneumoniae* degradiert. Vorinkubation mit Statinen verhindert die Degradation von I κ B α nach *C.pneumoniae*-

Infektion (oberer Teil der Abbildung 18). Die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wird dosisabhängig durch Statine gehemmt (unterer Teil der Abbildung).

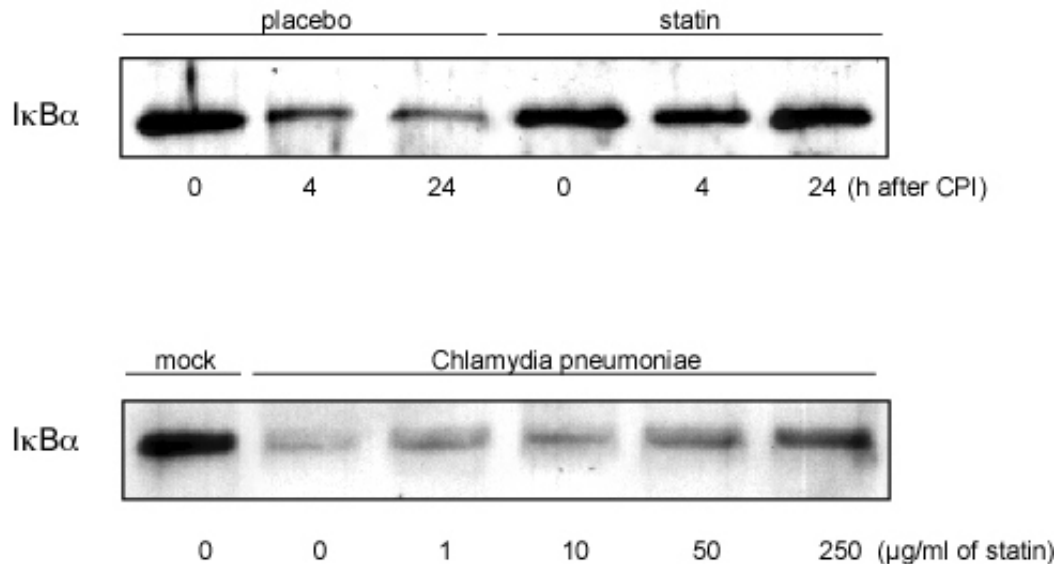


Abbildung 18: Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Infektion mit *C.pneumoniae*. oberer Teil der Abbildung: Zeitverlauf der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Expression. Vorinkubation mit einem Statin verhindert die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Unterer Teil der Abbildung: Dosisabhängigkeit des Statineffektes auf die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Expression.

Um herauszufinden, ob der beobachtete Effekt der Statine auf die Inhibition der Geranylisierung von RhoA und Rac1 zurückzuführen ist, haben wir als nächstes untersucht, ob Mevalonat die Effekte von Statinen auf NF- κB und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ aufheben kann (Abbildung 19). Mevalonat antagonisiert die Statineffekte auf NF- κB , $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und Rac1 nach *C.pneumoniae*-Infektion. Eine Vorinkubation mit Mevalonat allein hatte keinen Einfluß auf die untersuchten Parameter.

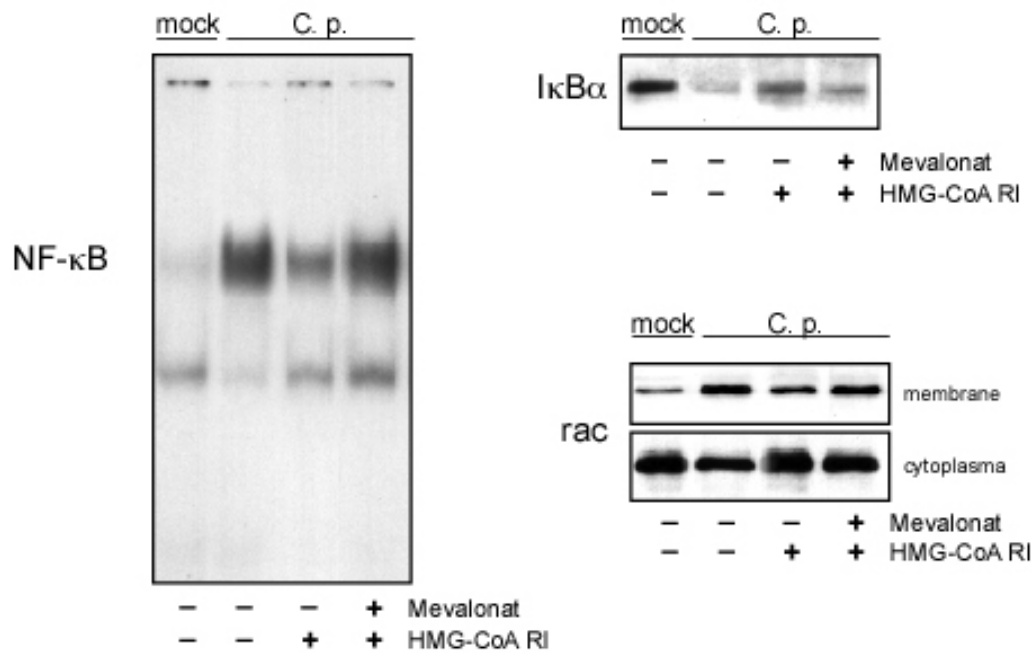


Abbildung 19: NF- κ B-Aktivität, I κ B α -Expression und Rac1-Expression nach *C.pneumoniae* Infektion und nach Vorinkubation mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren(Cerivastatin) und Mevalonat.

Um den weiteren Signaltransduktionsweg in glatten Muskelzellen nach *C.pneumoniae*-Infektion zu analysieren, haben wir untersucht, ob *C.pneumoniae* die Prenylierung von Rac1 und RhoA induziert und ob dieser Effekt durch Statine reduziert wird (Abbildung 20). Die Expression von Rac1 und RhoA an der Membran werden nach *C.pneumoniae*-Infektion gesteigert, während die zytoplasmatische Expression gleich bleibt oder leicht abnimmt. Dies ist ein biochemischer Hinweis auf eine Aktivierung der beiden Proteine. Statine in therapeutisch relevanter Dosierung hemmen die Prenylierung von Rac1 und RhoA. Aus dem Verhältnis der membranösen zur zytoplasmatischen Expression läßt sich die Aktivität von Rac1 und RhoA berechnen (Abbildung 20, unten).

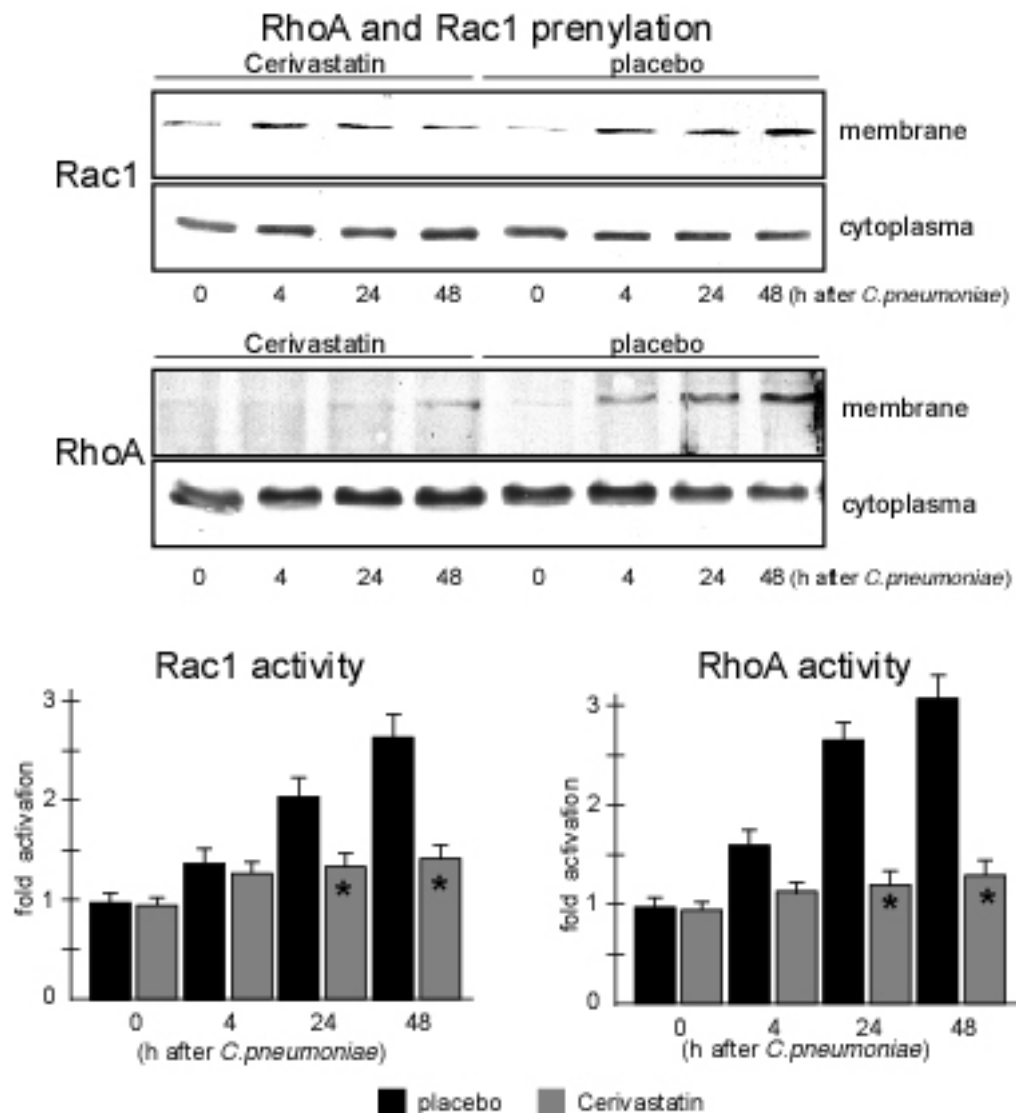


Abbildung 20: membrangebundene und zytoplasmatische Expression von Rac1 und RhoA nach *C.pneumoniae*-Infektion. Beide Proteine werden vermehrt an der Membran gebunden. Aus dem Verhältnis der membrangebundenen und der zytoplasmatischen Expression läßt sich die Aktivität von Rac1 und RhoA berechnen. Statine verhindern die *C.pneumoniae*-induzierte membrangebundene Expression von Rac1 und RhoA und damit die Aktivität der beiden Signaltransduktionswege.

Da die Expression von RhoA, die eine Untereinheit der vaskulären NADPH-Oxidase ist, durch *C.pneumoniae* induziert wurde, haben wir als nächstes untersucht, ob vermehrt Sauerstoffradikale durch *C.pneumoniae*-Infektion freigesetzt werden (Abbildung 21). Dazu haben wir die Cytochrome-C-Methode verwendet. Nach *C.pneumoniae*-Infektion kommt es zu einer Zunahme von Sauerstoffradikalen. Dieser

Effekt ist bereits 4 Stunden nach Infektion nachweisbar. Vorinkubation mit einem Statin reduziert die Sauerstoffradikalfreisetzung signifikant.

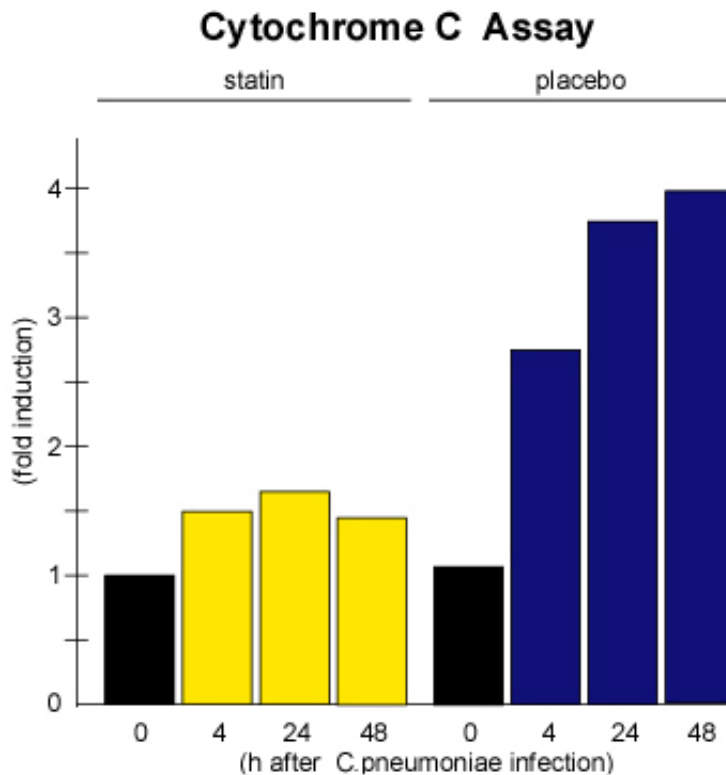


Abbildung 21: Cytochrome-C-Test zur Detektion von Sauerstoffradikalen. Bereits 4h nach *C.pneumoniae*-Infektion kommt es zu einer Zunahme von Sauerstoffradikalen in glatten Muskelzellen. Eine Vorinkubation mit Statinen reduziert die *C.pneumoniae*-induzierte Sauerstoffradikalfreisetzung.

Anschließend haben wir untersucht, ob die Expression von Zytokinen in glatten Muskelzellen induziert wird, die für die Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten verantwortlich sind. Deshalb haben wir Interleukin-6, Interleukin-8, RANTES und MCP-1 untersucht. Interleukin-6 wird im Überstand durch *C.pneumoniae* induziert (Abbildung 22, linke Abbildung). Bereits 10 µg/ml von Cerivastatin reduzieren die Expression im Überstand. Die IL-6-Induktion ist noch nach 24h nachweisbar. Auch zu späteren Zeitpunkten senken die Statine die IL-6-Expression (mittlere Abbildung). Analoge Ergebnisse haben wir erhalten, wenn wir mittels TaqMan die m-RNA-Expression gemessen haben. Geringe Dosierungen

IL-6

mock *Clamydia pneumoniae*

0 1 10 50 250

ELISA

mock *Clamydia pneumoniae*

0 1 10 50 250

mRNA

Die Expression von MCP-1 (Abbildung 23), Interleukin-8 (Abbildung 24), und RANTES (Abbildung 25), intrazellulär auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene im Zellkulturüberstand nach *C.pneumoniae*-Infektion, zeigt ein ähnliches Profil wie bereits für Interleukin 6 beschrieben. Ähnlich verhält sich der Effekt der Statine. 10 µg/ml Cerivastatin hemmen deutlich die *C.pneumoniae*-induzierte Expression des Zytokin auf Proteinebene im Überstand. Konzentrationen von 50 – 250 µg/ml reduzieren die Expression auf, bzw. unterhalb der Expression der unstimulierten Zelle. Dies gilt für alle 4 untersuchten Parameter. In der TaqMan-Analyse zeigt sich, dass tendenziell höhere Konzentrationen des Statins nötig sind, um die *C.pneumoniae*-induzierte Expression zu inhibieren. Auffällig ist, dass zur Hemmung von T-Lymphozyten-aktivierenden Zytokinen (RANTES und IL-8) höhere Statin-Konzentrationen benötigt werden als für die Inhibition von Makrophagen-aktivierenden Zytokinen (IL-6 und MCP-1).

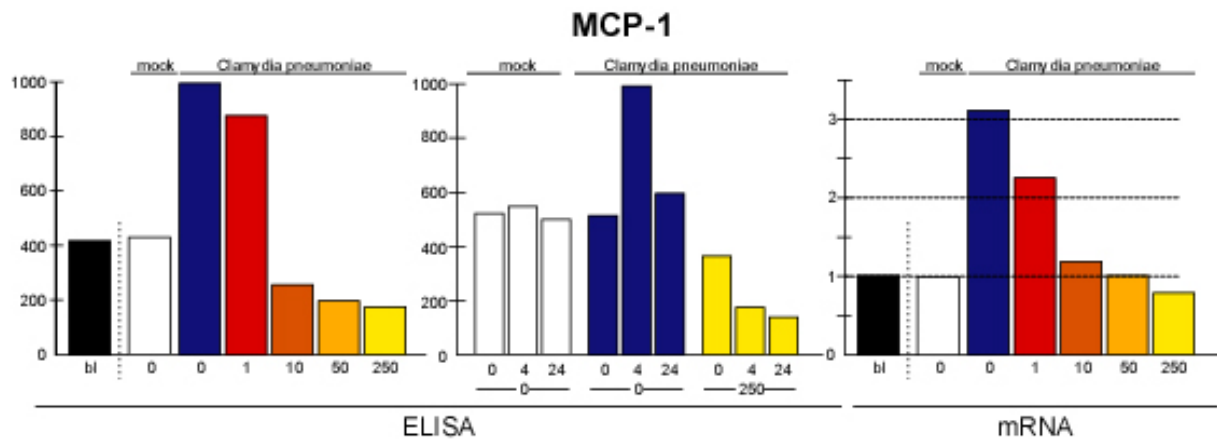


Abbildung 23: linke Abbildung: MCP-1-Expression im Überstand nach Mock und *C.pneumoniae*-Infektion (ELISA). Statine reduzieren die MCP-1-Induktion. Mittlere Abbildung: Zeitverlauf der MCP-1 Expression nach Vorinkubation mit Statinen. rechte Abbildung: mRNA-Expression (TaqMan) von MCP-1 nach *C.pneumoniae*-Infektion und Statin-Vorinkubation.

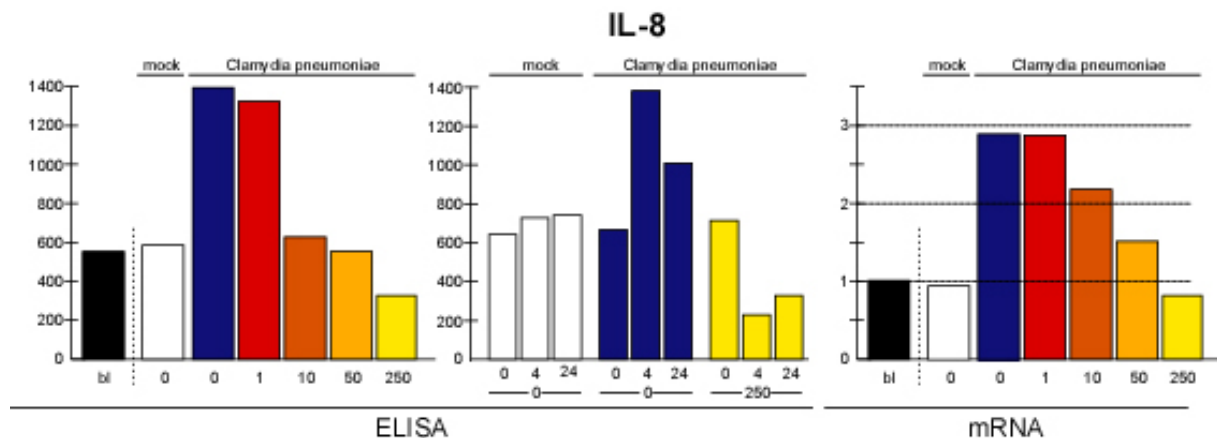


Abbildung 24: linke Abbildung: IL-8-Expression im Überstand (ELISA). Mittlere Abbildung: Zeitverlauf der IL-8-Expression. rechte Abbildung: mRNA-Expression (TaqMan).von IL-8

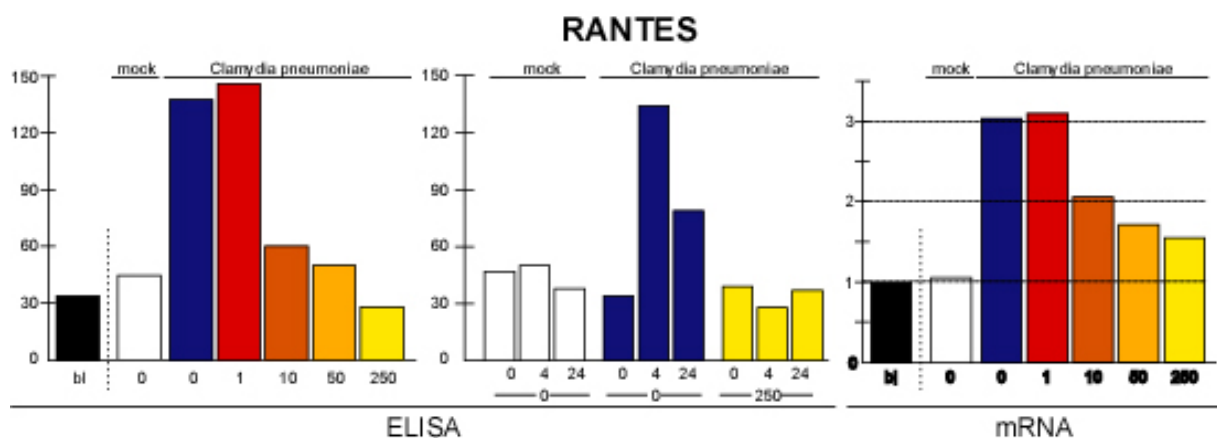


Abbildung 25: linke Abbildung: RANTES-Expression im Überstand (ELISA). Mittlere Abbildung: Zeitverlauf der RANTES-Expression. rechte Abbildung: mRNA-Expression (TaqMan).von RANTES

2.2.3.3 Reprint Paper 3

Dechend R, J Gieffers, R Dietz, A Joerres, J Rupp, FC Luft, M Maass
HMG-CoA Reductase Inhibition Reduces *Chlamydia pneumoniae*-induced Cell
Interaction And Activation,
Circulation 2003, 108; 261-265

2.2.4 Diskussion und Ausblick

Neben den klassischen Risikofaktoren für die Entstehung einer Arteriosklerose mehren sich die Berichte über eine Beteiligung verschiedener infektiöser Agenzien in der Induktion und Pathogenese dieser Erkrankung, wie *Chlamydia pneumoniae* oder auch Herpesviren.¹³⁸⁻¹⁴⁰

Seit kurzem wird die mögliche Beteiligung des obligat intrazellulären Bakteriums *Chlamydia pneumoniae* an der Pathogenese der Arteriosklerose diskutiert. Statistisch bedeutet die immunologische Auseinandersetzung mit dem Pathogen ein erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt.¹⁴¹ Der direkte Nachweis von Erregerstrukturen und die Isolierung replikationsfähiger Chlamydien aus atheromatösen Plaques haben diesen Zusammenhang erhärtet und bereits erste klinische Studien zum Einsatz von Antibiotika bei koronarer Herzkrankheit veranlasst.¹³⁶ Der experimentelle Beweis eines kausalen Beitrags der endovaskulären Infektion zur Pathogenese der Arteriosklerose lässt sich wegen Fehlens eines etablierten Tiermodells und eines Systems zur genetischen Rekombination des Erregers aber nicht unmittelbar erbringen.¹⁴² Das Fehlen eines verlässlichen Laborparameters für das Risiko einer koronaren Infektion erschwert das Verständnis des Krankheitsbildes zudem erheblich. Ob *Chlamydia pneumoniae* arteriosklerotische Veränderungen initiiert und zu ihrer Progression beiträgt oder lediglich bestehende Plaques kolonisiert, ist somit noch unklar.¹³⁹ Der Beweis einer atherogenetischen Relevanz der Chlamydieninfektion könnte die Therapiekonzepte für die führende Todesursache in Industrieländern revolutionieren. Die Datenlage rechtfertigt jedoch bisher eine experimentelle Antibiotikatherapie arteriosklerotischer Grunderkrankungen ausschließlich im Rahmen gut kontrollierter klinischer Studien.¹⁴⁰ Als chronisch-entzündliche Reaktion ist Arteriosklerose durch gesteigerte Synthese von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, Zellproliferation und Makrophagen-Migration charakterisiert.²⁴ Ob diese Gefäßschäden die *C. pneumoniae*-Ansiedelung ermöglichen oder durch sie verursacht werden, ist unklar. Menschliches Hitzeschock-Protein (HSP60) wird mit der Entzündung im Plaque assoziiert. Seit kurzem ist

bekannt, dass auch das Analog bei Chlamydien (cHSP60) eine Gefäßzellaktivierung induziert und mit humanem HSP60 im Atherom co-lokalisiert.³³ Die Gruppe von P. Libby konnte eine Co-Lokalisation des humanen Hitzeschockproteins 60 und dem von *C.pneumoniae* in arteriosklerotischem Material aufzeigen. Beide Hitzeschockproteine induzieren pro-inflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, sowie matrix-degradierende Metalloproteinasen.¹⁴³ Weitere Kandidatenproteine zur Induktion der Inflammation sind nur präliminär charakterisiert und bedürfen weiterer proteinchemischer Aufarbeitung, bevor ihre Funktion erfaßt werden kann.¹⁴⁴ Arteriosklerotische Läsionen sind durch Veränderungen der Interaktion von Integrinen, Integrinrezeptoren und Matrixmolekülen gekennzeichnet.³¹ Unklar ist, ob *C. pneumoniae* diese Veränderungen hervorrufen kann. Die Expression einzelner als pathogenetisch relevant vermuteter Gene kann mit herkömmlichen Techniken zwar detailliert beschrieben werden, einen umfassenden Überblick über die Veränderungen der Genexpression in der Endothelzelle unter Chlamydieninfektion könnte aber die Mikroarray-Technologie geben (Endothel-Chip).¹⁴⁵

Zirkulierende Monozyten können persistierend infiziert werden, d.h. die Chlamydien vermehren sich nicht und sind daher gegenüber Standard-Antibiotika refraktär.¹⁴⁶ Ob ein entsprechender Persistenzstatus auch in der Gefäßwand etabliert wird, ist unbekannt. Die exakte Analyse des genetischen Hintergrunds der Chlamydien-Persistenz ist vordringlich, da von unmittelbarer konzeptioneller Bedeutung für die laufenden Antibiotika-Studien bei Arteriosklerose.¹⁴² Da für den Persistenz- und Resistenzmechanismus kein Target-Gen bekannt ist, ist der umfassende Zugriff auf die differentielle Genexpression im replizierenden und persistierenden Zustand des Pathogens, dessen Genom seit kurzem vorliegt, über die Konstruktion eines *C. pneumoniae*-DNA-Chips erforderlich.¹⁴⁵

Die bei Hypercholesterinämie obligaten Lipidsenker reduzieren die Letalität in etwa 30 % der Fälle, nicht aber bei den übrigen 70 % („The forgotten majority“, P. Libby).³³ Der Nutzen dieser Statine ist weitgehend unabhängig vom Cholesterinspiegel im Blut. Statine inhibieren die IL-8- und MCP-1-Synthese *C. pneumoniae*-infizierter

Gefäßzellen, womit sich direkte Bezüge zur vaskulären Infektion ergeben.¹⁴⁷ Auch kann *C. pneumoniae*-LPS durch TNF α -induzierte Proteinlipase-Inhibition jene Lipidveränderungen hervorrufen, die als Arteriosklerose-Risikofaktoren definiert sind. Kontinuierliche LPS-Freisetzung, z.B. aus infizierten zirkulierenden Monozyten, könnte also eine atherogene Modifikation der Lipidmuster bewirken.¹⁴⁸ Ein integrierendes Modell zur Interaktion von Lipidmetabolismus, Lipidsenkung und Infektion fehlt.

Die Immunantwort gegen einen intrazellulären Erreger wie *C. pneumoniae* ist vorwiegend zellulär. Dennoch sind T-Zell-Epitope bisher kaum charakterisiert.¹⁴⁹ Eine Verbindung zur Arteriosklerose ergibt sich aus der nicht erklärten Akkumulation von T-Zellen im Plaque. Aus Plaques konnten bereits *C. pneumoniae*-spezifische T-Zellklone propagiert werden.¹³⁸ Zur Charakterisierung chlamydienspezifischer T-Zell-Epitope aus Gefäßmaterial von Patienten bzw. aus dem Tiermodell bietet sich die hochsensitive Tetramer-Technologie an.¹⁵⁰ Die Charakterisierung der zellulären Immunantwort ist zugleich Voraussetzung für eine eventuelle Impfstoffentwicklung.¹⁴⁹ Ein mikrobieller Befall arteriosklerotischer Plaques ist zweifelsfrei abgesichert, eine Infektgenese der Arteriosklerose ist damit jedoch nicht bewiesen: Kolonisation ist ebenso möglich wie Initiation oder Förderung der Progression.¹⁵¹ Die Bestimmung des Stellenwertes der vaskulären Infektion ist an zellbiologische Untersuchungen von Wirt und Pathogen, Charakterisierung der zellulären Immunität und ein Tiermodell gebunden.¹⁵²

Als eine mögliche (Mit-)Ursache entzündlicher Veränderungen werden Infektionen diskutiert, vor allem bei akuten koronaren Syndromen.¹⁵³ An größeren Populationen konnte aber kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Ereignissen und serologischen Befunden für z.B. *Chlamydia pneumoniae*, CMV oder *Helicobacter pylori* gezeigt werden. Andererseits lassen sich im Plaquematerial lebende Erreger nachweisen.¹⁴¹ Möglicherweise ist die entzündliche Gesamtbelastung („infectious burden“) als Trigger oder Promoter des entzündlichen Gefäßwandprozesses entscheidend.¹⁵⁴ Eine Infektion kann eine Ursache für eine Aktivierung der

Monozyten mit Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen sein. Eine weitere Möglichkeit ist die initiale Stimulation der Monozyten durch aktivierte Thrombozyten mit konsekutiver Freisetzung von Gewebefaktor und proinflammatorischen Substanzen einschließlich Interleukin-6.¹⁵⁵ Dadurch könnte zusätzlich die Akute-Phase-Reaktion verstärkt werden, wenngleich ischämisches Myokard vor Monozyten und geschädigter Gefäßwand als bedeutendste Interleukin-6 Quelle angenommen werden muss: Eine Akute-Phase-Reaktion lässt sich entsprechend nur bei Troponin-positiven akuten Koronarsyndromen zeigen. Monozyten sind außer durch CRP u. a. durch Fibrinogen und lymphozytenmoduliert prokoagulatorisch aktivierbar.¹⁵⁶

Die Anzucht des obligat intrazellulären Bakteriums *Chlamydia pneumoniae* aus arteriosklerotischen Plaques hat die Frage nach einer infektiösen Genese der Arteriosklerose aufgeworfen.¹²⁷ Chlamydien sind persistierende epitheliale Pathogene. Arteriosklerose ist jedoch eine chronisch-inflammatorische Erkrankung mesenchymaler Gefäßwandzellen. Eine bakterielle Beteiligung an der Entstehung der Arteriosklerose erscheint daher plausibler, wenn diese mesenchymalen Zellen eine *C.pneumoniae*-Infektion dauerhaft unterhalten können.¹³⁸ Daher wurden primäre und immortalisierte mesenchymale Zellen mit einem vaskulären und einem respiratorischen *Chlamydia pneumoniae*-Isolat inokuliert. Primäre humane Koronarendothelzellen, Gefäßmuskulaturzellen und Fibroblasten waren ebenso wie immortalisierte Zellen in der Lage, kontinuierliches Wachstum der Chlamydien zu unterhalten. Somit können die Zellen der Gefäßwand, die den atheromatösen Plaque bilden, eine kontinuierliche produktive *Chlamydia pneumoniae*-Infektion unterhalten.^{132,157} Immortalisierte monozytäre Zellen und Monozyten des peripheren Bluts konnten ebenfalls infiziert werden, jedoch nur über fünf Passagen. Monozyten/Makrophagen sind keine gefäßwandständigen Zellen, haben aber eine aktive Rolle in der Plaquebildung. Durch ihre Fähigkeit zu Zirkulation und transendothelialer Migration stellen sie potentielle Vektoren zur systemischen Verbreitung der Chlamydien dar.¹⁵⁸ Die Hypothese einer chronisch infektiösen Komponente in der multifaktoriellen Genese der Arteriosklerose wird durch diese

Resultate erhärtet. Folgestudien müssen die Zielzellen in vivo exakt definieren und zwischen einer Infektion permanent gefäßwandständiger Zellen und transmigrierter Makrophagen unterscheiden.¹⁵⁵ Eine endovaskuläre Infektion könnte zusätzliche Erklärungsmodelle für eine Reihe unklarer Phänomene der Arteriosklerose, wie mesenchymale Zellproliferation und die ausgeprägte inflammatorische Komponente, bieten.¹⁵⁹

Arteriosklerotische Gefäßerkrankungen wie Herzinfarkt bleiben trotz der Erfolge in der Bekämpfung bekannter Risikofaktoren die führende Todesursache. Neue Therapiekonzepte für diese chronisch-entzündliche Gefäßerkrankung sind notwendig.¹³⁷ Die Assoziation von Arteriosklerose und vaskulärer Infektion mit dem Bakterium *Chlamydia pneumoniae* eröffnet hier neue Zugänge wie den Einsatz von Antibiotika oder Impfstoffen, sofern sich eine Kausalität der Infektion für die Atherogenese belegen läßt. Voraussetzung ist das Verständnis der pathogenetischen Vorgänge auf Seiten des Erregers und des Wirts.²⁶ Die Erregerbiologie in den beteiligten Zelltypen, die Reaktionen der infizierten Gefäßzellen, die Interaktion mit eukaryonten Grenzflächen (Alveolarepithel und Gefäßendothel) als auch in vivo ein Tiermodell und die zelluläre Immunantwort sind Ansatzpunkte der weiteren Forschungen.¹⁴⁴

2.3 Projekt 3: Der Einfluss des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie von Entzündungsreaktionen auf den Angiotensin II- vermittelten kardiovaskulären Endorganschaden

2.3.1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache in Industrieländern. Bluthochdruck - in Deutschland gibt es etwa 16 Millionen Hypertoniker - ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Endorganschäden, die zum Versagen der Nieren- und Herzfunktion führen können.¹⁶⁰ Die genaue Ursache des Bluthochdruckes und seine Entstehung sowie die molekularen Pathomechanismen der Entstehung der Folgeerkrankungen sind bis heute nicht vollständig geklärt.¹⁶¹ Klinische Studien haben eine Verbindung zwischen der Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und dem Auftreten ischämischer Ereignisse belegt. Studien mit ACE-Hemmern zeigten deren protektiven Effekt für das kardiovaskuläre System.¹⁶² Die dieser Beobachtung zugrunde liegenden Mechanismen werden aber noch nicht vollständig verstanden.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Blutdrucks, der Elektrolyt- und Volumenhomöostase sowie bei pathomorphologischen Veränderungen bestimmter Organe. Neben seinen vasoaktiven und wachstumsfördernden Wirkungen aktiviert Ang II zirkulierende Leukozyten und Endothelzellen und fördert dadurch entzündliche Veränderungen sowie die extrazelluläre Matrix-Bildung.¹⁶³

Neben dem klassischen zirkulierenden humoralen RAS konnten in den letzten Jahren auch lokale Gewebe-RAS unter anderem in Herz und Niere identifiziert werden.¹⁶⁴ Dies führte dazu, dass Angiotensin (ANG) II nicht nur als ein im Blutkreislauf zirkulierendes Hormon, sondern auch als ein auto- und parakrin wirksames Gewebshormon angesehen wird, dessen Bildung in den einzelnen Zielorganen selbst reguliert werden kann.¹⁶⁵ Lokal gebildetes und freigesetztes Ang I und Ang II kann zu den zirkulierenden Plasmaspiegeln beitragen und direkt zu einer

Vasokonstriktion führen. Diese lokale ANG-Bildung ist hauptsächlich von Renin abhängig.³⁵

Als Modell für einen erhöhten Ang II-Spiegel verwendeten wir doppelt-transgene Ratten (dTGR). Dieses Modell wurde von Ganten et al. und Fumikazu et al. entwickelt.^{166,167} Das humane AOPEN-Konstrukt besteht aus dem gesamten humanen AOPEN-Gen (5 Exons und 4 Introns), flankiert von 1.3 kB am 5' Ende und 2.4 kB am 3' Ende; das humane Reninkonstrukt aus dem gesamten genomischen Bereich des humanen Reningens (10 Exons und 9 Introns) mit 3.0 kB der 5' Region des Promoters und zusätzlichen 1.2 kB der 3' Sequenz.¹⁶⁸ Die Tiere gehen aus der Kreuzung der homozygoten humanen AOPEN-Linie und der homozygoten humanen Renin-Linie hervor. Die dTGR-Ratten exprimieren neben ihrem eigenen RAS das humane Renin - und humane AOPEN-Gen. Ratten, die nur einzeln transgen für humanes AOPEN oder humanes Renin sind, sind normoton. Humanes Renin spaltet nur humanes AOPEN, während Ratten-AOPEN nur als Substrat für Ratten-Renin dient. Das aus den beiden Systemen entstehende Ang I ist identisch und wird auf gleiche Weise zu Ang II umgewandelt.¹⁶⁹ Unbehandelte dTGR-Ratten entwickeln Bluthochdruck, Niereninsuffizienz mit einer ausgeprägten Albuminurie, Vaskulopathie und schwere linksventrikuläre Hypertrophie mit fokalen Nekrosearealen. Sie sterben bereits im Alter von 7-8 Wochen.^{170,171} Aufgrund des Schweregrades der Nieren-, Herz- und Gefäßschädigung eignet sich das Modell in besonderer Weise zur Untersuchung der Pathogenese und der Ang II-bedingten Organschäden, aber auch für die Untersuchung der Wirksamkeit von Inhibitoren.^{89,172}

2.3.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, neue molekulare Mechanismen bei der Pathogenese Ang II-vermittelter Endorganschäden herauszufinden. Dabei sollen durch Intervention pharmakologischer Inhibitoren Erkenntnisse über molekulare Signaltransduktionswege bei Ang II-induzierten Nieren-, Herz- und Gefäßschäden gewonnen werden. Im Detail sollen untersucht werden:

- molekulare Mechanismen bei Ang II-/Hypertonie-bedingten Nieren-, Herz- und Gefäßschäden
- der Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und Gerinnungsaktivierung intra- und extravaskulär
- der Einfluss des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf die Organschädigung
- der Einfluss von Entzündungsreaktionen auf die Organschädigung
- die pleiotropen, cholesterinunabhängigen Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf den kardiovaskulären Endorganschaden

2.3.3 Ergebnisse und Darstellung einzelner Studienergebnisse

2.3.3.1 Die Wirkung von Renin-Inhibitoren, ACE-Hemmern, AT1-Rezeptor-antagonisten sowie blutdrucksenkenden Substanzen auf Tissue Faktor und den Ang II-vermittelten Endorganschaden (Reprint P4)

Lokale Ang II-Wirkungen sind für Herz-, Nieren- und Gefäßschädigungen von besonderer Bedeutung.¹⁷³ Wir haben daher in den letzten Jahren ein transgenes Tiermodell (dTGR) untersucht, welches das humane Renin- und AOGN-Gen überexprimiert.¹⁷¹ Unbehandelte dTGR-Ratten entwickeln Bluthochdruck, Niereninsuffizienz, Vaskulopathie und schwere linksventrikuläre Hypertrophie mit fokalen Nekrosearealen, die wahrscheinlich auf der Basis von fibrinoiden Nekrosen und Gefäßverschlüssen entstanden sind. dTGR-Ratten entwickeln eine über 100-fach erhöhte Albuminurie. Die Ang II-Spiegel im Plasma, im Herz und in der Niere sind, verglichen mit nicht-transgenen Sprague-Dawley (SD)-Ratten, 3- bis 5-fach erhöht (Abbildung 26).^{89,174-176}

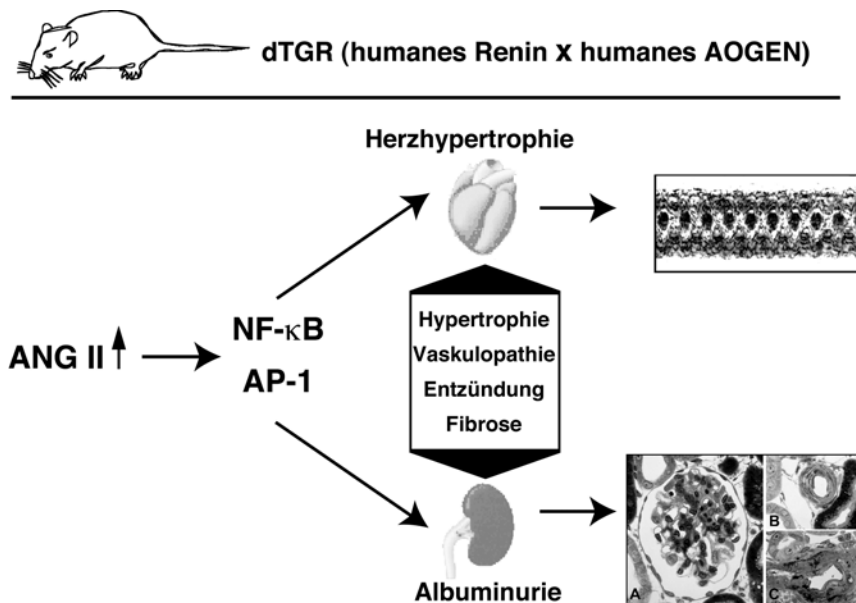


Abbildung 26: Schema des doppelt-transgenen Rattenmodells

Wir konnten in verschiedenen Studien am dTGR-Modell zeigen, dass Renininhibitoren mit ACE-Hemmern und AT1-Rezeptorblockern vergleichbare Erfolge bei der Prävention von Organschäden brachten.^{170,177-179} Sämtliche Inhibitoren verhinderten die Entstehung von Myokardinfarkten und Nierenschädigungen, die bei unbehandelten Tieren zum Tod führten. Die Endorganschadenprotektion war nicht primär von der Höhe des Blutdruckes abhängig. Eine Vergleichsstudie eines Renininhibitors mit der klassischen antihypertensiven Dreier-Therapie (Reserpin, Dihydralazin und Hydrochlorothiazid) zeigte, dass bei Normalisierung des Bluthochdruckes nur der Renininhibitor in der Lage war, die Entstehung des Endorganschadens zu verhindern.¹⁷⁰ Wir konnten ferner nachweisen, dass Ang II die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 stimuliert und somit verschiedene durch NF-κB und/oder AP-1 regulierte Proteine beeinflusst, die eine Rolle bei der Entstehung des kardiovaskulären Endorganschadens spielen. In unbehandelten transgenen Tieren kam es zu einer Aktivierung sowohl der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 als auch des Chemokins MCP-1. Alle 3 Moleküle führten schließlich zu einer erhöhten Infiltration von Leukozyten (Abbildung 27).

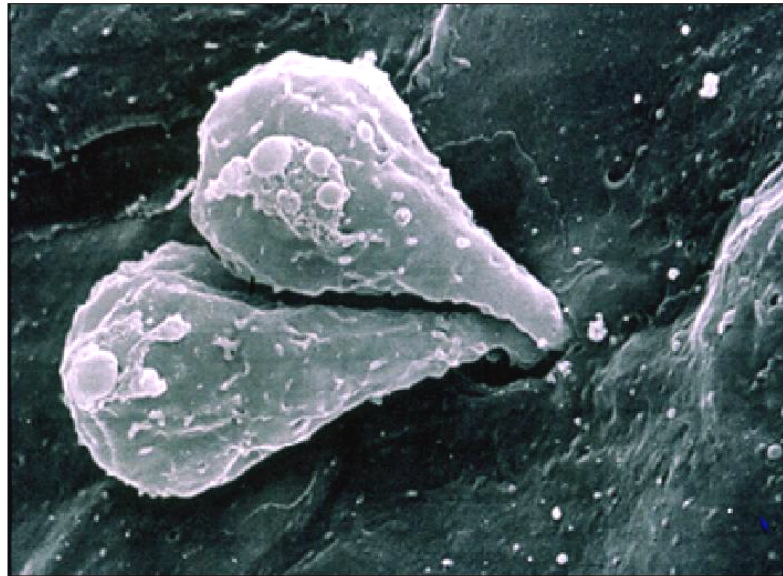


Abbildung 27: Leukozytenadhäsion und Transmigration in dTGR-Ratten

Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen setzen daraufhin zytotoxische Stoffe frei, die dann wiederum die Transkriptionsfaktoren aktivieren (Circulus vitiosus). Zu weiteren zytotoxischen und pathologischen Parametern, die in dTGR-Ratten stimuliert waren, zählen die induzierbare NO-Synthase und der Tissue Faktor. Beide Gene besitzen in ihrer Promoterregion ebenfalls NF- κ B- und AP-1- Bindungsstellen. Sämtliche Inhibitoren verhinderten die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren sowie die Aktivierung der durch NF- κ B und/oder AP-1 regulierten Gene. Auch die daraus resultierenden Entzündungsreaktionen und Fibrosierung sowie die Bildung von prokoagulativen Substanzen im Herzen und der Niere konnten vermindert werden.

Tissue Faktor ist ein Schlüsselprotein, welches sowohl Gerinnungsprozesse initiiert als auch eine intrazelluläre Signaltransduktion einleitet.¹⁸⁰ Somit kommt diesem Protein eine besondere Bedeutung zu. Wir haben in mehreren Studien die Expression von Tissue Faktor untersucht.^{175,176,181} Die Expression und Aktivität von Tissue Faktor ist erhöht in Gefäßen, Nieren und am Herzen von dTGR ist deutlich erhöht gegenüber SD Organen. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass in den gleichen

Organen jeweils die Aktivität und Expression der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 erhöht sind.

In einer Interventionsstudie mit dem Endothelin-Antagonisten Bosentan konnten wir zeigen, dass der kardiovaskuläre Endorganschaden deutlich reduziert wurde, obwohl der Effekt auf den Blutdruck nur gering war.¹⁸¹ Dihydralazin hatte bei gleichem Effekt auf den Blutdruck keinen positiven Einfluß auf den kardiovaskulären Endorganschaden. In der Studie haben wir die Expression und Aktivität von NF- κ B, AP-1 und Tissue Faktor untersucht. Die immunohistochemische Analyse mit Phasenkontrastmikroskop zeigt die Lokalisation von aktiviertem NF- κ B/p65 in der Niere. Die Expression von p65 ist erhöht im Endothel, in glatten Muskelzellen der kleinen Gefäße, Glomeruli, Entzündungszellen und Tubuli von unbehandelten dTGR Tieren (Abbildung 28). In nicht-transgenen SD Tieren war eine Expression von aktiviertem p65 nicht nachweisbar.

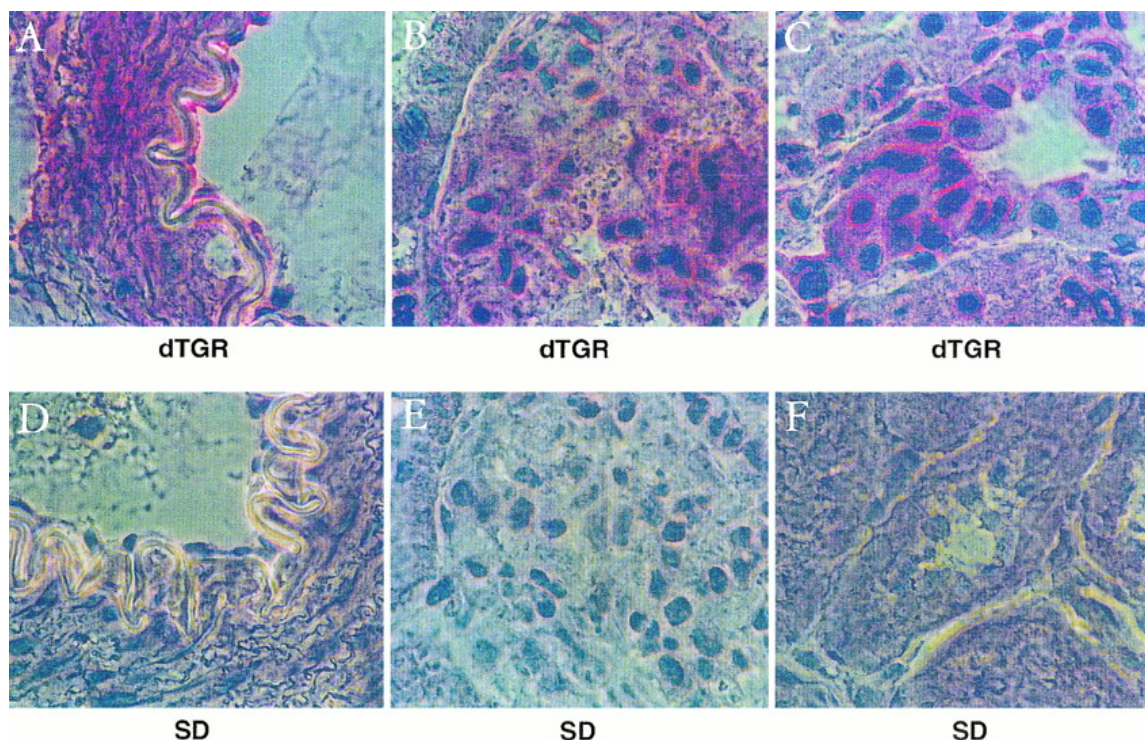


Abbildung 28: Expression von aktiviertem NF- κ B/p65 in Nieren von dTGR Tieren (obere Reihe) und nicht transgenen SD-Tieren (untere Reihe).

Parallel zur einer erhöhten Expression von NF- κ B war die Aktivität von NF- κ B in den Nieren von unbehandelten dTGR im Vergleich zu SD erhöht. Bosentan reduziert die NF- κ B-Aktivität deutlich. Dihydralazin-behandelte Nieren zeigen weiterhin eine erhöhte NF- κ B-Aktivität, vergleichbar mit unbehandelten dTGR (Abb. 29 A - C). Die Expression des wichtigsten Inhibitors für NF- κ B, I κ B α , ist reduziert in dTGR (Abb. D). Bosentan-Therapie verhindert die Degradation von I κ B α , während Dihydralazin keinen Einfluss hat. Die Abbildungen E - G zeigen die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 im Herzen. AP-1 Aktivität war erhöht in dTGR im Vergleich zu SD und konnte durch Bosentan reduziert werden.

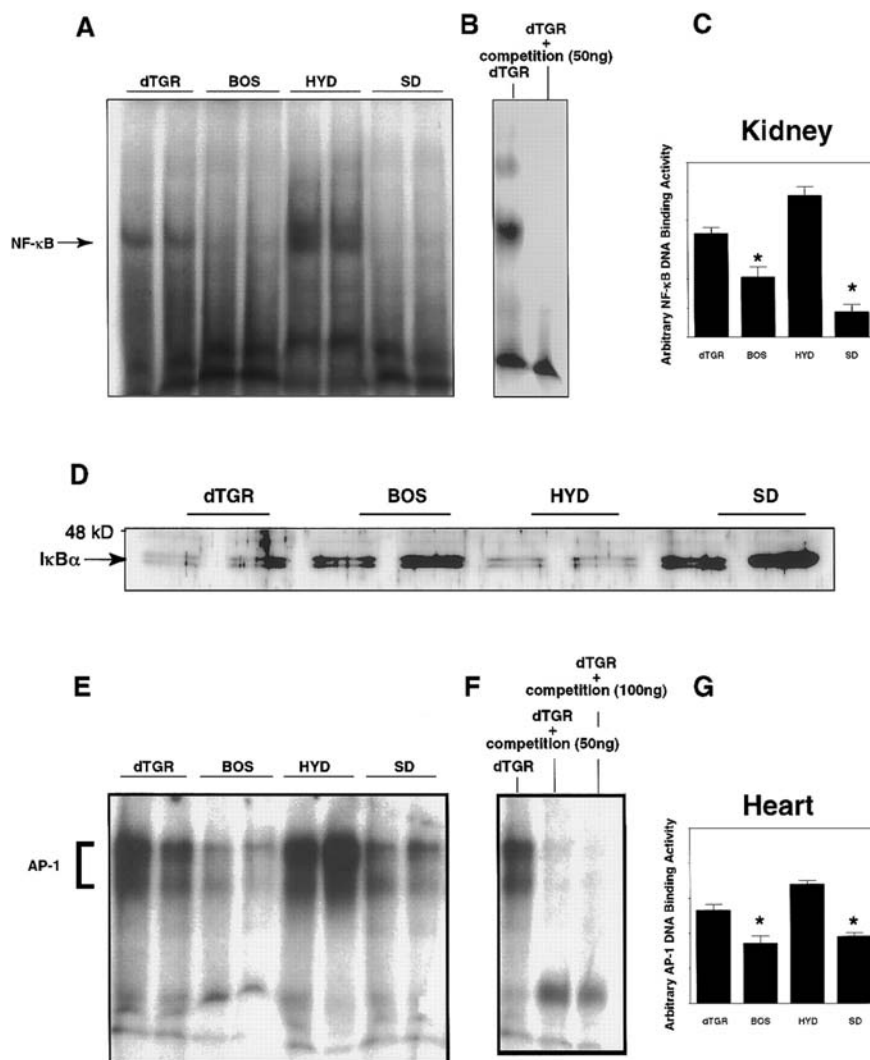


Abbildung 29: NF- κ B-Aktivität in Nieren (Abb. A), Kompetition mit unmarkierten Oligonukleotiden (Abb. B), Quantifizierung des NF- κ B Bandshift (Abb. C), Expression von I κ B α (Abb. D), AP-1-Aktivität im Herzen (Abb. E), Kompetition mit unmarkierten Oligonukleotiden (Abb. F), Quantifizierung der AP-1- Bandshift (Abb. G)

Abbildung 30 A-D zeigt die Expression von NF- κ B, Abbildung E-G die Expression von Tissue Faktor in konsekutiven Schnitten. Die Expression von Tissue Faktor ist erhöht in unbehandelten und Dihydralazin behandelten dTGR (Abb. 30E und G), während Bosentan die Tissue Faktor Expression deutlich reduzieren kann (Abb. F). Die Regionen, in denen eine vermehrte Tissue Faktor Expression aufweisen, zeigen auch eine erhöhte NF- κ B Expression.

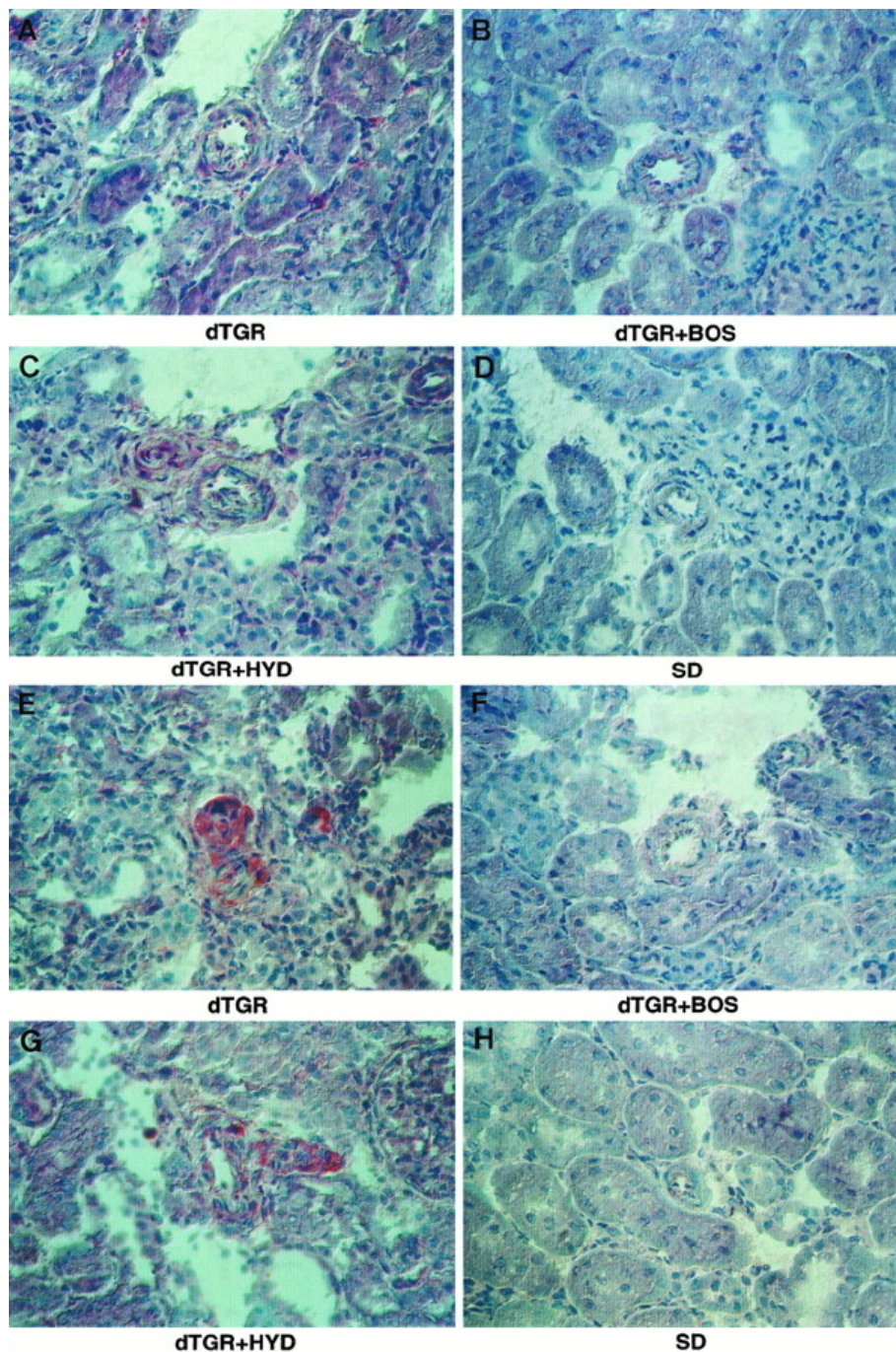


Abbildung 30: A – D: Expression von NF- κ B, in konsekutiven Schnitten (Abb. 30 E – H) ist die Expression von Tissue Faktor dargestellt.

In einer weiteren Inhibitorstudie mit einem Endothelin-Converting-Enzyme- (ECE) Inhibitor konnten wir zeigen, dass der kardiovaskuläre Endorganschaden durch diese Therapie positiv beeinflusst wird, während der renale Schaden unbeeinflusst bleibt.¹⁸¹ Die Mortalität wurde durch den ECE-Inhibitor signifikant gesenkt. Dabei zeigte sich, dass die extrazelluläre Matrixbildung durch den ECE-Inhibitor reduziert wird. Die Expression von Collagen I und Fibronektin sind in der Adventitia und um die Gefäße herum besonders hoch in dTGR, werden aber durch den ECE-Inhibitor deutlich gesenkt. Weiterhin haben wir die kardiale Expression von Tissue Faktor untersucht. In dTGR ist die Expression von Tissue Faktor am höchsten in der Gefäßwand, der Adventitia und in Entzündungszellen. Abbildung 31 zeigt die Expression in dTGR sowie die Reduktion der Expression durch den ECE-Inhibitor. Die Expression in ECE-Inhibitor behandelten dTGR ist jedoch noch immer höher als in nicht-transgenen SD-Tieren.

Tissue Factor

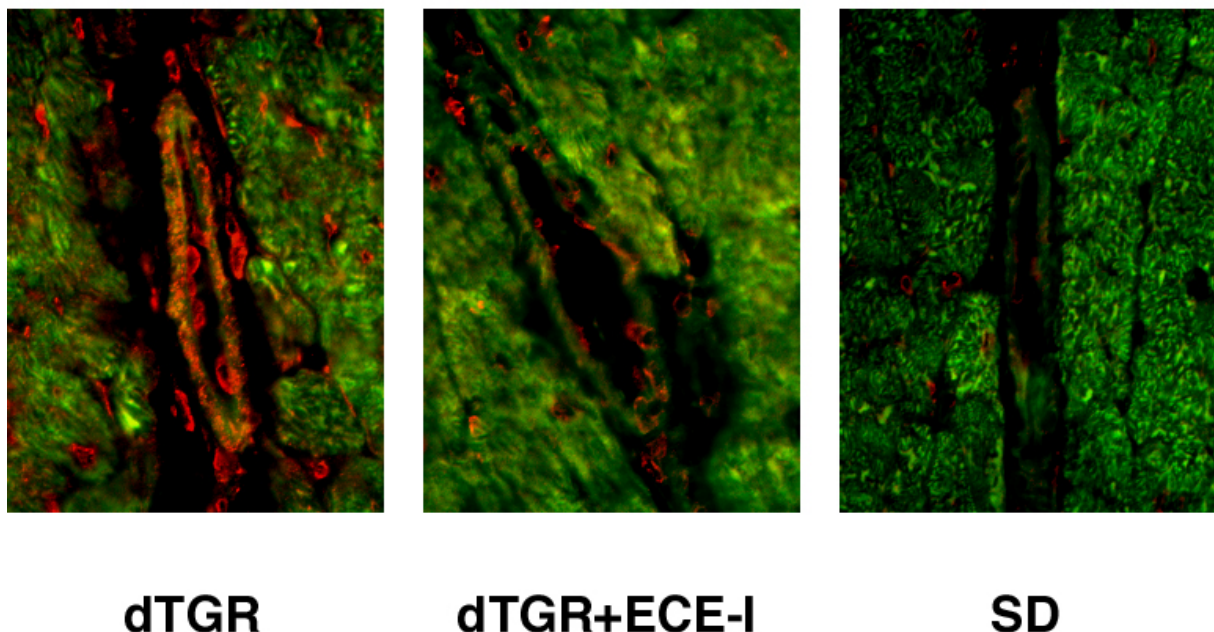


Abbildung 31: Tissue Faktor-Expression in kardialen Gefäßen

2.3.3.2 Reprint P 4

Dechend R*, DN Müller*, EMA. Mervaala*, A Fiebeler, JK Park, F Schmidt, J Theuer,
V Breu, N Mackman, T Luther, DC Gulba, D Ganten, H Haller, FC Luft
AT1 receptor blockade reduces tissue factor via inhibition of NF-kB and AP-1 in
angiotensin II-induced cardiac damage
Am J Pathol. 2000;157:111-22

*shared co-author (contributed equally)

2.3.3.3 Die Wirkung von anti-entzündlichen und immunsuppressiven

Inhibitoren auf NF- κ B, Entzündung und den Ang II-vermittelten

Endorganschaden (Reprint P5 und P6)

Die Erkenntnis, dass verschiedene Behandlungen, die indirekt immer wieder die Leukozyteninfiltration verhindert hatten, Organschäden verbessern, führte zu der Hypothese, dass in dem untersuchten Tiermodell Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Endorganschäden spielen könnten.

Wir haben daher Studien mit anti-entzündlichen Inhibitoren (PDTC, Aspirin, Etanercept (löslicher TNF α -Rezeptor)), die die Aktivierung von NF- κ B verhindern, sowie mit immunsuppressiven Substanzen wie Cyclosporin, Dexamethason und Mykophenolat-Mofetil durchgeführt.^{182,183} Sämtliche Inhibitoren verbesserten den Ang II-vermittelten Organschaden. Es war besonders erstaunlich, dass eine immunsuppressive Therapie, in einem per se nicht-immunologischen Modell, eine derart organprotektive Wirkung ergab. Es zeigte sich auch hierbei immer wieder, dass die Organprotektion nicht direkt mit der Höhe des Blutdruckes korreliert.

Wir haben 2 Interventionsstudien mittels PDTC und Aspirin mit dem Ziel durchgeführt, NF- κ B und die daraus resultierenden Entzündungsreaktionen am Herzen und in der Niere zu hemmen.^{93,98} Eine chronische Behandlung der dTGR-Ratten mit dem Antioxidans Pyrrolidondithiocarbamat (PDTC), einem unspezifischen NF- κ B-Inhibitor, reduzierte die Albuminurie um mehr als 95% und verbesserte die Herzhypertrophie signifikant, obwohl der Blutdruck mit 168 mm Hg immer noch deutlich höher lag als bei nicht-transgenen Kontrolltieren.⁹³ PDTC hemmte die NF- κ B-Aktivität am Herzen und in der Niere, nicht jedoch die von AP-1. Die Makrophagen-Infiltration war unter PDTC geringer als bei unbehandelten dTGR-Ratten. Die Ergebnisse sind in Reprint P5 dargestellt.

In einer weiteren Studie behandelten wir dTGR-Ratten mit einer niedrigen, thrombozytenaggregationshemmenden und einer hohen anti-rheumatischen Dosis Aspirin.⁹⁸ Yin et al. zeigten, dass Aspirin in Zellkulturexperimenten die I- κ B-Kinase (IKK)-beta, die NF- κ B-Aktiviert, hemmen kann. Wir untersuchten deshalb, inwieweit

Aspirin die $I\kappa B\beta$ in vivo inhibiert und so den Ang II-vermittelten Endorganschaden verbessern kann.¹⁸⁴

Überraschenderweise reduzierte nur die hohe Dosis von Aspirin (ASS 600) die Mortalität signifikant, während die geringe Aspirin-Dosis (ASS 25) keinen Einfluss auf die Mortalität hatte. Beide Aspirin-Dosierungen hatten keinen Einfluss auf die arterielle Hypertonie im Vergleich zu Placebo-behandelten dTGR. Die Herzhypertrophie ebenfalls wurde mittels Echokardiographie untersucht. Es zeigte sich, dass die Herzhypertrophie durch ASS 600 deutlich reduziert wurde, während ASS 25 keinen Einfluß hatte. Auch der Nierenschaden (z.B. Albuminurie) wurde durch ASS 600 signifikant geringer. Die niedrige Dosis schien unwirksam zu sein. Anschließend untersuchten wir die Thromboxanspiegel. Wir fanden, dass dTGR-Ratten mit hohen wie auch niedrigen Dosen Aspirin, im Vergleich zu unbehandelten dTGR-Ratten, signifikant niedrigere Thromboxan-B₂-Spiegel hatten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die organprotektive Wirkung von Aspirin nicht durch die Thrombozytenaggregation erklärt werden kann.

Wir untersuchten deshalb die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Beide Transkriptionsfaktoren wurden am Herzen und in der Niere nur durch die hohe Dosis Aspirin signifikant gesenkt. Als nächstes untersuchten wir, ob die NF- κ B-Aktivierung durch chronische aktivierte $I\kappa B$ -Kinasen entsteht. Die $I\kappa B$ -Aktivität aus Nieren war erhöht in dTGR Ratten und wurde durch Aspirin gesenkt. Neben der Aktivität war auch die Expression des IKK-Komplexes in den Nieren von dTGR erhöht. Als wichtiges NF- κ B- und AP-1-reguliertes Protein in der Entzündungsreaktion haben wir das Adhäsionsprotein VCAM-1 untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression in Gefäßen von Herz und Nieren der Placebo-behandelten dTGR Ratten erhöht ist. Nur die hohe Dosis Aspirin inhibiert die erhöhte Expression von VCAM-1. Weiterhin wurde die Expression des natürlichen Liganden von VCAM-1: VLA-4 ebenfalls durch die hohe Dosis Aspirin gesenkt.

2.3.3.4 Reprint P 5

Dechend R*, Müller DN*, Mervaala EMA, Schmidt F, Park J-K, Fiebeler A, Theuer J,
Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC.

Inhibition of NF- κ B protects against end-organ damage in rats with human renin and
angiotensinogen genes.

Hypertension 2000, 35: 193-201

*,shared co-author (contributed equally)

2.3.3.5 Reprint P 6

Dechend R*, Muller DN*, Heissmeyer V*, Hampich F, Park JK, Fiebeler A,
Shagdarsuren E, Theuer J, Pilz B, Breu V, Schroer K, Ganten D, Dietz R, Haller H,
Scheidereit, C, Luft FC.

Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage.

FASEB J. 2001 ;15:1822-4

*,shared co-author (contributed equally)

2.3.3.6 Die Untersuchung des cholesterinunabhängigen Wirkmechanismus von Statinen *in-vivo* und *in-vitro* (Reprint P7)

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren haben protektive Wirkung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen.¹⁸⁵ Die cholesterinsenkende Wirkung scheint nicht der alleinige Mechanismus für den positiven Effekt der Statine zu sein.¹⁴⁷ Wir wollten deshalb untersuchen, welchen Einfluss der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Cerivastatin *in vivo* auf den Ang II-vermittelten Endorganschaden hat. Die Sterblichkeit betrug in der dTGR-Gruppe nach 7 Wochen 45%; Cerivastatin reduzierte die Mortalität signifikant auf 20%. Auch die Herzhypertrophie ging unter Cerivastatintherapie signifikant zurück, war jedoch gegenüber gesunden, nicht-transgenen SD-Ratten erhöht. Die Plasmacholesterinwerte der drei Therapiegruppen unterschieden sich nicht. Albuminurie, Plasmaharnstoff und Plasmakreatinin, die in dTGR-Ratten stark erhöht sind, wurden durch Cerivastatin ebenfalls signifikant gesenkt, ebenso der Blutdruck. Wir glauben aber, dass dies kein direkter Effekt von Statinen auf den Blutdruck, sondern ein sekundärer Effekt durch Verhinderung einer terminalen Niereninsuffizienz ist. Letztendlich können wir aber einen direkten Effekt mit dieser Studie nicht ganz ausschließen. Im übrigen wurde die extrazelluläre Matrixproduktion wie auch die zelluläre Infiltration und Expression der Adhäsionsproteine ICAM-1 und VCAM-1 im Herzen und in der Niere durch Cerivastatin deutlich gesenkt, wobei jedoch alle Werte höher waren als in gesunden SD-Ratten (Abbildung 32)

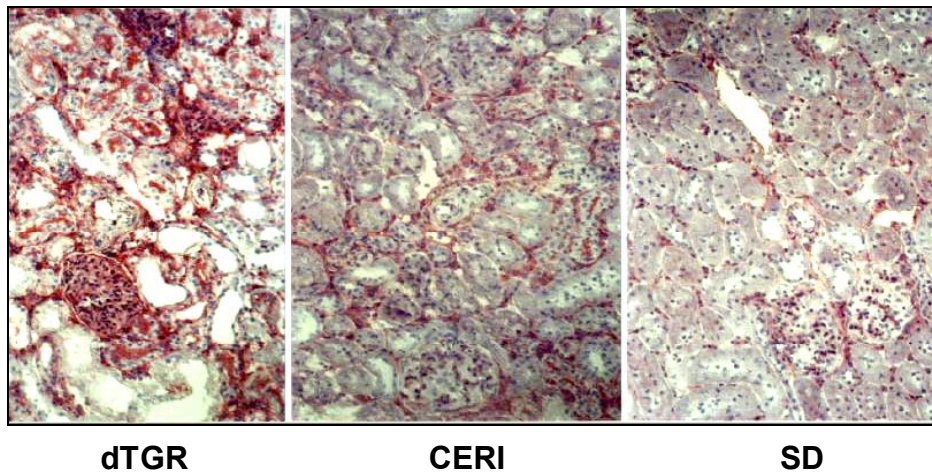


Abbildung 32: ICAM 1 Expression in der Niere

Als nächstes haben wir die Signaltransduktionskaskade untersucht. dTGR-Ratten zeigen eine erhöhte Expression von aktivierter phosphorilierter ERK 1/2 (extrazelluläre signalregulierte Kinase), insbesondere in der Gefäßwand, im Interstitium und in den Glomeruli. p-ERK wurde durch Cerivastatin stark reduziert (Abbildung 33).

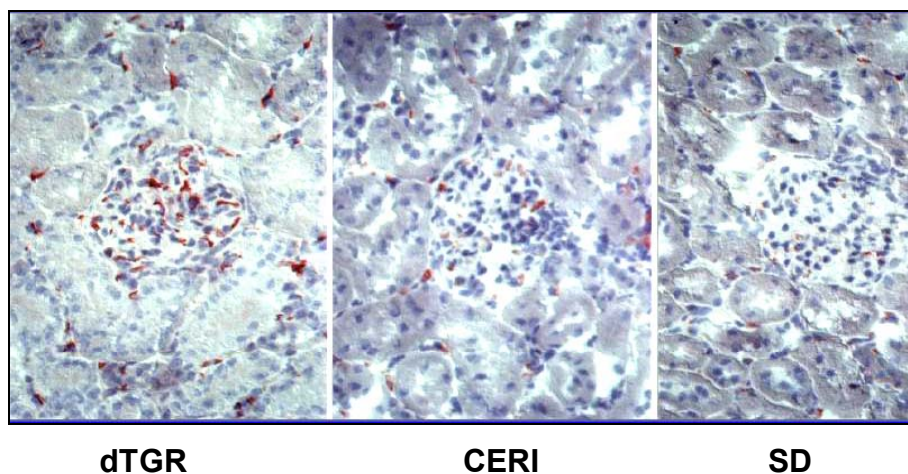


Abbildung 33: ERK 1/2 Expression in der Niere

Auch die NF- κ B- und AP-1- Aktivität wurde in der Niere durch Cerivastatin reduziert. Um zu zeigen, dass die Effekte des Cerivastatins tatsächlich unabhängig vom Blutdruck und Cholesterin sind, haben wir die Signaltransduktion in vitro untersucht. Ang II-Stimulation führte zur ERK 1/2-Phosphorilierung und konnte durch Cerivastatin

gehemmt werden (Abbildung 34). Um zu zeigen, dass Proteine wie Ras, Rho und Rac involviert sind, haben wir den hemmenden Effekt von Cerivastatin durch Mevalonat oder Farnesylphosphat aufgehoben.

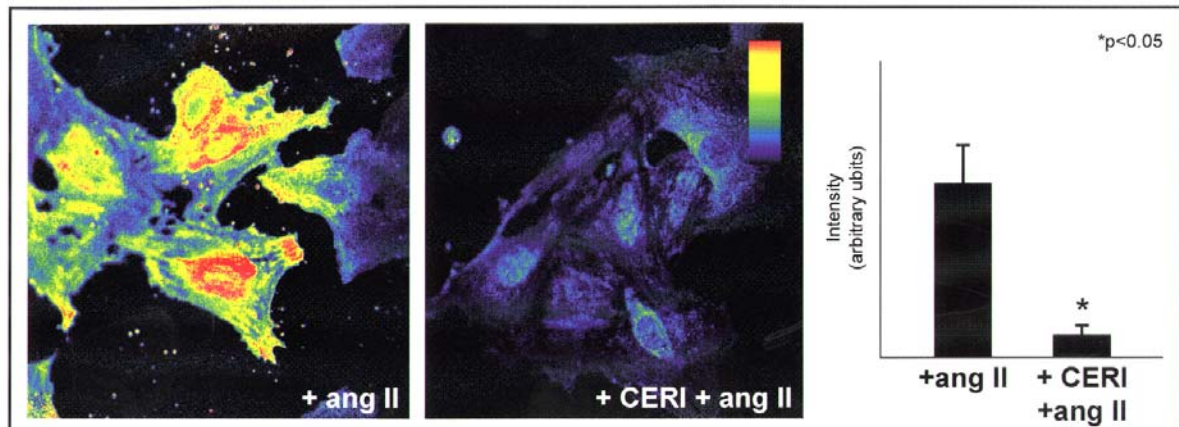


Abbildung 34: pERK Phosphorilierung in VSMC nach Stimulation mit Ang II

2.3.3.7 Reprint Paper 7

Dechend R, Fiebeler A, Park J-K, Müller DN, Theuer J, Mervaala EMA, Bieringer M,
 Gulba D, Dietz R, Luft FC, Haller H:
 Amelioration of angiotensin II-induced cardiac Injury by an HMG-CoA reductase
 inhibitor.

Circulation 2001;104:576-81.

2.3.4 Diskussion und Ausblick

Arterielle Hypertonie stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für vaskuläre, renale und kardiale Organschäden dar.³⁴ Dass eine erhöhte kardiovaskuläre und renale Morbidität und Mortalität durch eine konsequente antihypertensive Therapie gesenkt werden können, ist durch viele Studien belegt.⁴ Die pathophysiologischen und molekularen Mechanismen, die zum renalen Endorganschaden führen, sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.⁶ Aus pathologisch-anatomischen Untersuchungen ist bekannt, dass die ersten Schäden an den Nierengefäßen stattfinden, gefolgt von einer Nephrosklerose mit sekundären Schäden an Glomeruli und Tubuli. Die Spätstadien gehen mit einer Einschränkung der Nierenfunktion bis zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz einher.¹⁸⁶

Einer der wichtigsten Faktoren in diesem Prozess ist das Oktapeptid Angiotensin II, das Schlüsselenzym des lokalen und zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems. Die physiologische und zelluläre Wirkung von Ang II wird über zwei verschiedene Ang II-Rezeptoren (AT1 und AT2) vermittelt.¹⁸⁷ Ang II ist ein multifunktionelles Peptid, das stark vasokonstriktiv wirkt und an Herz und Gefäßen zu einer Hypertrophie führt. Ang II wirkt als direkter Wachstumsfaktor und induziert die Fibrogenese.¹⁸⁸ Zusätzlich stimuliert Ang II zirkulierende Leukozyten und endotheliale Zellen und fördert dadurch entzündliche Veränderungen sowie die Akkumulation von extrazellulärer Matrix und Gerinnungsproteinen.¹⁸⁹ Beide biologischen Effekte werden durch verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt, die durch Ang II-vermittelte Entzündungsreaktion scheint als pathogenetisch wichtigster Mechanismus in den Vordergrund zu treten.¹⁹⁰

Wir haben zeigen können, dass die Reduktion des Endorganschadens an Niere und Herz nicht primär von der Beeinflussung des Blutdrucks abhängt. Eine Inhibierung des Renin-Angiotensin-Systems (durch ACE-Hemmer, AT1-Blocker oder Reninantagonisten) führte teilweise unabhängig von deren Effekt auf den Blutdruck zu einer Reduktion bzw. Beseitigung des Endorganschadens.^{170,174} Demgegenüber senkte die Dreier-Therapie aus Hydralazin, Reserpin und Hydrochlorothiazid effektiv

den Blutdruck, doch führte diese Therapie nicht zu einer Abnahme der Mortalität und des Endorganschadens. Dieses "Uncoupling" von hypertoniebedingtem Endorganschaden und Senkung des arteriellen Blutdrucks hat dazu geführt, dass wir vermehrt das lokale RAS untersucht haben, um die zellulären Mechanismen aufzuklären, die für die Entstehung des Endorganschadens verantwortlich sind. Dabei konnten wir zeigen, dass die Aktivität und Expression von NF- κ B in den Gefäßen, im Herz und in der Niere von dTGR stark gesteigert sind.

Die Bedeutung der Ang II-induzierten NF- κ B-Aktivierung und konsekutiv unterhaltenen Entzündungsreaktion wurde durch pharmakologische Interventionsstudien gestärkt. Die Gabe des Antioxidants PDTC senkte die Mortalität um 40 % und verringerte den Endorganschaden an Herz und Niere.⁹³ Die Albuminurie unter PDTC nahm um 95 %, die Infiltration von Makrophagen in der Niere um 70 % und im Herzen um 60 % ab. Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnten wir eine verringerte Expression und Aktivität von NF- κ B durch PDTC aufweisen, während AP-1 unverändert blieb. Demgegenüber war der Effekt auf den Blutdruck durch PDTC zu vernachlässigen. Dies ist für uns ein wichtiger Hinweis, dass der Blutdruck per se nicht die einzige Determinante für die Entstehung des Endorganschadens ist. Weitere pharmakologische Interventionen mit Cyclosporin A, Aspirin in hoher Dosierung und Dexamethason führten trotz höherem Blutdruck als in der dTGR-Gruppe durch ihre anti-inflammatorische Potenz zu einer Reduktion des Endorganschadens.^{98,182,183} Im einzelnen sahen wir bei allen drei Therapieansätzen eine Abnahme der Albuminurie, der Nephrosklerose (Abnahme von Collagen I, IV, Laminin und Fibronectin), eine Reduktion der Mortalität, der Herzhypertrophie und der Makrophageninfiltration, sowie eine verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen, NADPH-Oxidase, iNOS und Gerinnungsproteinen. Aufgrund der Tatsache, dass alle untersuchten Proteine, von denen bekannt ist, dass sie an der Entstehung eines Endorganschaden beteiligt sind, durch NF- κ B reguliert werden und wir bei allen erfolgreichen Therapiestrategien eine Reduktion der Expression und

Aktivität von NF- κ B gefunden haben, sind wir der festen Überzeugung, dass NF- κ B eine Schlüsselrolle bei Ang II-induzierten Endorganschäden spielt.

Ziel dieses Projektabschnittes war es, neue molekulare Mechanismen bei der Pathogenese Ang II-vermittelter Endorganschäden herauszufinden. Die Entstehung von Ang II-vermittelten Endorganschäden ist durch komplexe Interaktionen verschiedener endo- und parakriner Systeme bedingt.¹⁹¹ Das lokale Gewebe-Renin-Angiotensin-System war, wie auch Endothelin-1, Aldosteron sowie die RAS-Signaltransduktion, an der Pathogenese des Ang II-vermittelten Endorganschadens beteiligt.¹⁹² Die Organschädigung war nicht primär durch den hohen Blutdruck bestimmt. In vivo stellt sich die Differenzierung von hämodynamischen und nicht-hämodynamischen Ang II-Wirkungen nicht ganz einfach dar. Griffin et al. zeigten, dass Ang II bei Ratten, zum Teil über blutdruckunabhängige Mechanismen, zu Gefäßhypertrophie führt.¹⁹³ Eine gleichzeitige Infusion von Ang II und dem Vasodilatator Dihydralazin führte zu einer blutdruckunabhängigen Proliferation von Zellen in den Mesenterialgefäßen und Karotiden. In transgenen Mäusen, die Ratten-Aogen lokal im Herzen überexprimieren, kam es zu einer lokalen Ang II-Produktion, die wiederum, blutdruckunabhängig, eine Myokardhypertrophie auslöste.¹⁹⁴ Bei einer Vielzahl der in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren (Endothelin-Rezeptorblocker, Statin, Aldosteron-Antagonist, Aspirin, PDTC, Etanercept, Dexamethason, Mycophenolat-Mofetil) war der Blutdruck signifikant höher als in nicht-transgenen SD-Ratten.^{93,98,170,175,178,181-183,195,196} Die in vitro Wirkung von Statinen zeigte bei unseren Zellkulturexperimenten zur Ang II-stimulierten ERK1/2-Phosphorylierung ebenfalls einen blutdruckunabhängigen Einfluss.¹⁹⁷

Ein weiterer Hauptbefund war, dass entzündliche Prozesse eine Schlüsselrolle in der Entstehung des kardiovaskulären Endorganschaden spielen.¹⁹⁸ Vor wenigen Jahren ist NF- κ B als ein essentieller Transkriptionsfaktor, der Entzündungsreaktionen aktiviert und reguliert, beschrieben worden.⁸⁰ NF- κ B ist in Makrophagen, Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Glomeruli und Tubuli existent. Im Gegensatz zu den meisten Transkriptionsfaktoren liegt NF- κ B im unaktivierten

Zustand komplexgebunden an seinem Inhibitor I κ B im Zytoplasma vor.¹⁹⁹ Durch eine Vielzahl von externen Stimuli (TNF α , IL-1, PDGF) kommt es über den I κ K-Komplex zur Phosphorylierung und Degradation von I κ B. Nach der I κ B-Degradation können die NF- κ B-Dimere in den Nukleus gelangen, sich an κ B-Stellen binden und somit die Aktivierung von Zielgenen induzieren.⁶⁶ Dazu gehören neben vielen anderen IL-1, IL-6, IL-8, Interferon- γ , TNF α , die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die Gerinnungsproteine Tissue Faktor und PAI-1 sowie das Chemokin MCP-1.⁶⁵ Ang II kann NF- κ B über den AT1- wie auch über den AT2-Rezeptor aktivieren.²⁰⁰ Eine klassische Hemmung mit RAS-Inhibitoren konnte - ebenso wie eine Blockade von Endothelin-1 oder die Signaltransduktionshemmung durch Statine bzw. TNF α Hemmung mit Etanercept - die NF- κ B-Aktivierung in dTGR-Nieren und am Herzen reduzieren.^{98,175,179,201} Alle Inhibitoren waren außerdem in der Lage, die Leukozyten-Infiltration zu reduzieren sowie verschiedene durch NF- κ B-regulierte Gene zu hemmen. Ein möglicher Signaltransduktionsweg, wie Ang II NF- κ B aktivieren könnte, ist die Stimulation der membrangebundenen NAD(P)H-Oxidase und eine daraus resultierende Sauerstoffradikalbildung.^{202,203} Unsere Studie mit PDTC ergab, dass ein Antioxidans in vivo NF- κ B und so auch die Entzündungsreaktion unterdrückt.⁹³ Dexamethason-Behandlung konnte in vitro die Sauerstoffradikalbildung sowohl bei Ang II-stimulierten Makrophagen als auch in dTGR-Nieren hemmen.¹⁸³ Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass NF- κ B auch bei kardiovaskulären Erkrankungen von Bedeutung ist. Morishita et al. konnten durch NF- κ B-Inhibition mit der "Decoy"-Methode den Infarkt nach Reperfusionsschaden verringern.⁸⁴ So konnten auch Tomita et al. die Organschädigung durch "NF- κ B-Decoys" bei Glomerulonephritis und bei entzündlichen Transplantationsschäden verringern.²⁰⁴ Ruiz-Ortega et al. und andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls zeigen können, dass NF- κ B durch Blockade des RAS gehemmt werden kann.^{87,205,206} Die Arbeitsgruppe von Remuzzi hat beschrieben, dass Albumin NF- κ B auch bei Zellkulturexperimenten in Tubuluszellen aktivieren kann.²⁰⁷ Bei Nierenschäden mit Albuminurie könnte somit eine erhöhte Belastung der Tubuli durch Albumin zu einem NF- κ B-vermittelten entzündlichen

Schaden führen. Wir können diesen Mechanismus für unsere dTGR-Ratten zwar nicht komplett ausschließen, wir meinen aber, dass er eher unwahrscheinlich ist, da unveröffentlichte Daten unserer Gruppe belegen, dass 4-5 Wochen alte dTGR-Ratten noch keine ausgeprägte Albuminurie, aber schon eine signifikant erhöhte Entzündungsreaktion zeigen.

Kopp et al. und Pierce et al. konnten mit Aspirin bzw. Salicylat die Aktivierung von NF- κ B verhindern.^{208,209} Unsere Studie mit Aspirin bestätigte in einem in vivo Modell die in vitro Ergebnisse von Pierce. Wie in den Zellkulturexperimenten konnten auch in vivo nur sehr hohe Aspirindosen NF- κ B hemmen und die Herz- und Nierenschäden verringern. Allerdings hemmten hohe Dosen Aspirin nicht nur NF- κ B, sondern auch AP-1. AP-1, ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor, der bei Herzhypertrophie von Bedeutung ist, reguliert verschiedene Matrixmoleküle wie Kollagen I und IV sowie Fibronektin. Die Matrixbildung ist in unbehandelten dTGR-Ratten stark ausgeprägt und konnte durch Aspirin, aber auch durch RAS-Blockade, Endothelin-Rezeptorblocker, Statine und Aldosteronantagonisten reduziert werden. Auch die daraus resultierenden Entzündungsreaktionen, die Fibrosierung sowie die Bildung von prokoagulativen Substanzen im Herzen und der Niere konnten vermindert werden (Abbildung 35).

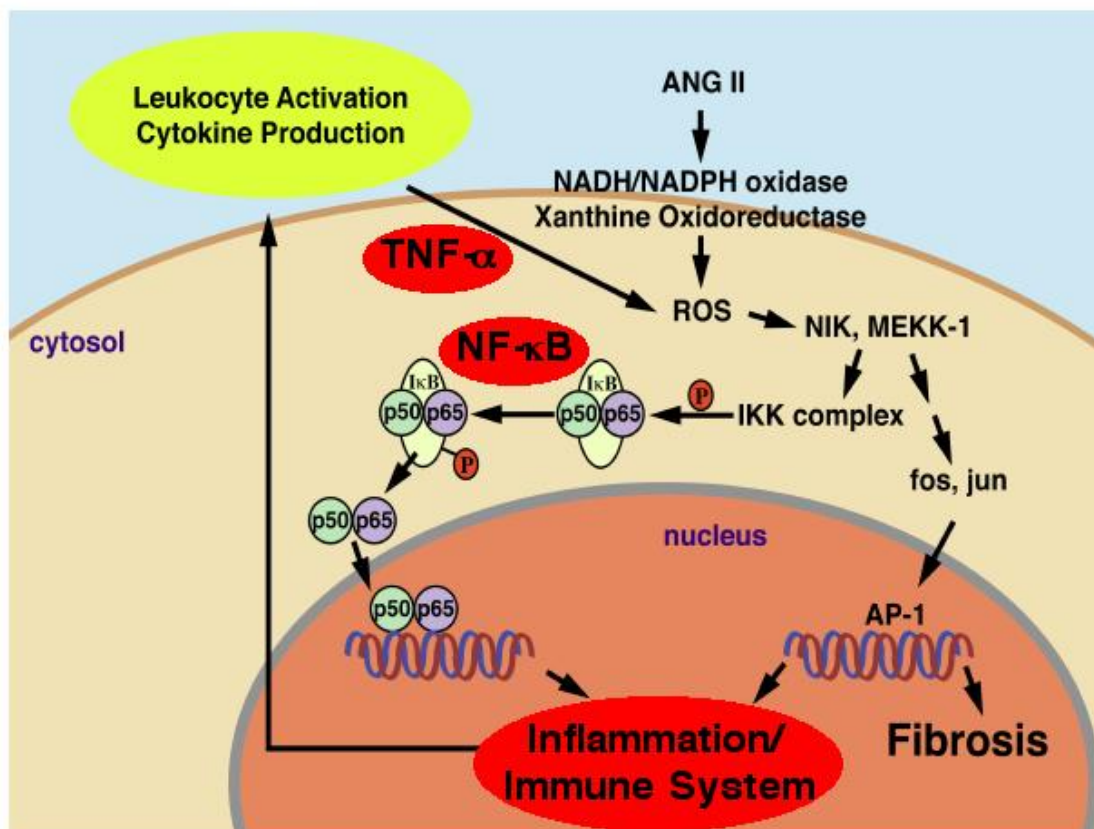


Abbildung 35: schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen, die zu dem Ang II-vermittelten Endorganschaden führen

2.4 Projekt 4: Die Bedeutung aktivierender Autoantikörper gegen den Angiotensin 1-Rezeptor und der Entzündungsreaktion in der Präeklampsie

2.4.1 Einleitung

2.4.1.1 Allgemeines

Präeklampsie ist definiert als ein Anstieg des Blutdrucks nach der 20. Schwangerschaftswoche auf ($>140/90$ mm Hg) mit Proteinurie (> 300 mg/l) in Patientinnen, die vorher keine Hypertonie oder Nierenveränderungen aufgewiesen haben²¹⁰. Unter Eklampsie versteht man das Auftreten von Krämpfen bei Patientinnen mit Präeklampsie. Es kommt zu charakteristischen Veränderungen in Plazenta, Niere und Leber.²¹¹ Präeklampsie hat die höchste Inzidenz in der ersten Schwangerschaft. Insgesamt 5-10 % aller Schwangerschaften weltweit entwickeln eine Präeklampsie. Die Unterschiede sind aber regional sehr groß und variieren von 2-5% bis maximal 19%. Nach neuesten Untersuchungen gehen in Deutschland 25% aller maternalen und fetalen Komplikationen in der Schwangerschaft/Geburt auf eine Präeklampsie zurück.²¹² Damit ist die Präeklampsie eine Hauptursache für mütterliche Morbidität und Mortalität sowie die Hauptursache für kindliche Frühgeburtlichkeit und Morbidität.⁴³ Die Häufigkeit der Präeklampsie nimmt mit jeder folgenden Schwangerschaft ab und ist so bei der zweiten Schwangerschaft um das 6-8fache niedriger.²¹³ Dieser relative Schutz in den folgenden Schwangerschaften ist nicht mehr vorhanden, wenn die Kinder mit verschiedenen Vätern gezeugt werden, was die Bedeutung der väterlichen Gene in der Pathogenese unterstreicht.⁴⁴ Die Inzidenz von Präeklampsie ist erhöht bei jungen Schwangeren, Mehrlingsschwangerschaften, Diabetes mellitus, Übergewicht und anderen Erkrankungen, die mit einer Autoimmunkrankheit assoziiert sind (wie Anti-Cardiolipin Antikörper-Syndrom).²¹⁴ Die Häufigkeit einer Präeklampsie steigt mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft und beginnt selten vor dem Ende des 2. Drittels

der Schwangerschaft. Die Symptome einer Präeklampsie verschwinden rasch nach Beendigung der Schwangerschaft.²¹⁵

Auch die initiale Hoffnung, dass durch rapide Blutdrucksenkung sowie durch Gabe von Aspirin und Kalzium bzw. durch konsequente Behandlung von Schwangerschaftshypertonie die Inzidenz und der Schweregrad der Präeklampsie verringert werden könnten, hat sich nicht erfüllt.²¹⁶ Bisher konnten die pathophysiologischen Veränderungen und die molekularen Mechanismen in der Präeklampsie in vivo nicht untersucht werden.⁴² Aus diesem Grund ist weitere wissenschaftliche Erforschung der Mechanismen und der Therapie der Präeklampsie erforderlich. Die Ursache für Präeklampsie ist trotz intensiver Forschung noch ungeklärt.²¹⁷ Nach dem jetzigen Stand der Wissenschaft sind aber eine immunologische Komponente und eine Fehlregulation des Renin-Angiotensin Systems in dem Krankheitsprozess involviert.^{47,218}

2.4.1.2 Pathologische Veränderungen sowohl der Plazenta und des präplazentaren Gefäßbettes als auch extraplazentarer Organe

Es wird ein akuter arteriosklerotischer Prozeß der Basilararterien, und zwar in ihrem myometrialen Abschnitt und am Übergang zur intradezidualen Spiralarterienstrecke beobachtet.²¹⁹ Dabei treten fibrinoide Wandnekrosen, eine diffuse Fibrininsudation, Lipidakkumulation, Makrophagen und perivaskuläre monozytäre Infiltrate sowie zusätzliche Fibrinthromben auf. Was die Plazenta anbelangt, handelt es sich um eine Veränderung, die als Folge einer chronischen bzw. akuten Durchblutungsstörung anzusehen ist. Charakteristisch hierbei ist als erstes das vermehrte Auftreten von Proliferationsknospen am Chorionepithel als Antwort auf einen durch die intervillöse Hypoperfusion bedingten Sauerstoffmangel.⁴⁵ Bei anhaltender Durchblutungsinsuffizienz gehen die Knospen in regressiv veränderte Epithelknoten mit Kern- und Zelluntergang über. Die hypoxische Schädigung des Epithels führt lokal zur Hyperkoagulabilität mit inter- und perivillöser Fibrinbildung und herdförmiger Verödung des Intervillosums, zu Konfluenz dieser Herde und zu mikro- und

makroskopisch erkennbaren Gitterinfarkten mit progressiver Einschränkung der plazentaren Austauschfläche.²²⁰ Die intervillöse Mangel durchblutung hat herdförmig eine Minderung auch des intravillösen fetalen Blutdurchflusses zur Folge.²²¹ Dies führt zu Fibrintranssudation in das Zottenstroma (intravillöses Fibrin, fibrinoide Zottendegeneration) und zu einer fortschreitenden Fibrose des Zottenstromas. Häufige Zeichen einer kompensatorischen reaktiven Blutraumgewinnung in der Plazenta sind eine Angiomatose oder eine Zottenfrühreife.²²² Infolge einer vorzeitigen Lösung und einer akuten Durchblutungsinsuffizienz treten akute hämorrhagische Infarkte auf, die durch Alterung in chronische Herde übergehen können.²²³ Weitere wesentliche pathologische Veränderungen sind in folgenden Organen nachweisbar.

Niere: Auf Grund der pathophysiologischen Veränderungen kommt es zu einer Schwellung der Endothelzellen mit Einengung bis Obliteration der Glomerulumkapillarlichtungen²²⁴ und zu herd- und bandförmigen Fibrinablagerungen zwischen Basalmembran und Endothelzelle.²²⁵ Bei präexistenter Hypertonie entsteht dabei eine Gefäßsklerose. Postpartal kommt es zu einer Rückbildung dieser Veränderungen.²²⁶

Leber: Im Frühstadium der Präeklampsie ist sie nicht betroffen.²¹⁰ Bei präeklampsischen Todesfällen jedoch findet man in 80-90% der Fälle eine Organminderdurchblutung aufgrund von Gefäßspasmen sowie fibrinreicher Gefäßwandnekrosen mit Lumeneinengung und disseminierten Fibrinthromben. Makroskopisch sieht man eine große bunte Leber mit Wechsel blasser anämischer und rötlicher hämorrhagischer Partien. Mikroskopisch findet man Parenchymnekrosen, Blutungen, Blutseebildungen und subkapsuläre Hämatomausbreitung.⁴²

Gehirn: Man beobachtet Gefäßwandnekrosen, Fibrinthromben, petechiale Blutungen, Rindennekrosen und Marklagererweichungen.

2.4.1.3 Hypothesen der Präeklampsieentstehung

Da die Ursache der Präeklampsie noch nicht bekannt ist, gibt es verschiedene Theorien.⁴² Diese lassen sich in drei Kategorien einordnen.

Genetische Ursachen: Verschiedene Autoren haben auf eine genetische Prädisposition bei der Entstehung der Präeklampsie hingewiesen.⁴⁶ Chesley beobachtete vor einigen Jahren, dass Töchter und Schwestern von präeklampsischen Frauen ein 30%iges Risiko besitzen, an Präeklampsie zu erkranken, gegenüber 5 % in der Normalbevölkerung.²²⁷ Somit könnte die Präeklampsie durch einen rezessiven bzw. einen dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz erklärt werden. Diese Penetranz könnte vom fetalen Genotyp abhängen.²¹⁰ Alternativ zeigen andere Experimente, dass die väterlichen Gene für die unvollständige Penetranz verantwortlich gemacht können.²²⁸ Die Arbeitsgruppe von Ward hat zeigen können, dass ein Polymorphismus im Angiotensin-Gen zu einer erhöhten Inzidenz von Präeklampsie führt. Diese Mutation führt ebenfalls zu einer erhöhten Expression des Angiotensin-Proteins in der Plazenta.²²⁹

Plazentare Ischämie⁴⁵: Um ein ausreichendes Nährstoffangebot für das ungeborene Kind zur Verfügung zu stellen, muss die Plazenta auf ein "Niederdruck"-System umgestellt werden, d.h. die Arterien in der Plazenta müssen umgebaut werden.²³⁰ Sie dürfen - im Gegensatz zu den anderen Gefäßen im Körper der Schwangeren - nicht auf vasokonstriktorische Stimuli reagieren.⁴⁵ Die potentesten vasokonstriktorischen Stimuli sind Angiotensin (ANG) II, Thromboxan und Endothelin.²²¹ Die Plazenta erreicht die Nicht-Ansprechbarkeit auf solche Reize, indem die glatte Muskelschicht und die Endothelzellen durch einwandernde Trophoblasten zerstört und ersetzt werden. Eine wichtige Voraussetzung für diesen Vorgang ist die Differenzierung der Trophoblasten, die dadurch einen anderen Phänotyp (vaskulärer Phänotyp) annehmen.²³¹ Durch eine plazentare Ischämie kommt es zu einer Unterfunktion dieser Trophoblasten. Anders als ein vaskulärer Phänotyp exprimiert der ischämische Trophoblast Zytokine, Gerinnungsproteine und

Sauerstoffradikale, was zu einer endothelialen Dysfunktion führt.²³² Die Ursache für die plazentare Ischämie ist noch nicht identifiziert. Viele Autoren sehen eine ursächliche Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems an der Ischämie, indem das RAS eine vermehrte Vasokonstriktion ausübt.²³³ Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Renin in der Plazenta von präeklampsischen Schwangeren erhöht war. Gant et al. stellten eine Hypersensitivität bei präeklampsischen Frauen gegenüber Angiotensin II fest.

Immunologische Ursachen⁴⁷: Die Interaktionen zwischen dezidualen Leukozyten und dem invasiven Cytotrophoblast ist essentiell für die normale Trophoblastentwicklung.²³⁴ Auffällig dabei ist, dass in der gesunden Plazenta eine einzigartige immunologische Konstellation vorliegt, die Toleranz gegen die kindlichen Antigene ermöglicht.²³⁴ Was genau diese immunologische Toleranz bewirkt, ist unklar. Sowohl der HLA-Typus der Trophoblasten als auch die vorhanden Entzündungszellen (sogenannte "large granular Lymphocytes") sind einzigartig im Körper.²³⁵ Bei der Präeklampsie ist die Interaktion zwischen Trophoblast und Leukozyt gestört. Statt der "schwangerschafts-schützenden" Zytokine wie Interleukin-8, Interferon- γ werden die Cytokine gebildet, die die oben beschriebenen endotheliale Dysfunktion verstärken.²³² Eine mögliche Ursache für das gestörte Zusammenspiel könnte das Auftreten von Autoantikörpern sein. Dadurch wird die protektive Immunantwort in eine aggressive moduliert.²³⁶

2.4.1.4 Vorarbeiten

Wahrscheinlich spielen frühe Störungen der Plazentation eine wesentliche Rolle für die Entwicklung der Präeklampsie.²³⁷ Die verminderte Throphoblasteninvasion in den myometrialen Anteil der Spiralarterien führt zu einem verminderten intervillösen Blutfluss und einer damit verbundenen Hypoxie der fetoplazentaren Einheit.²³⁸ Die plazentare Hypoperfusion führt wahrscheinlich über eine Endothelzellschädigung zu einem abnormalen Prostaglandinmetabolismus, der intervaskulären Aktivierung des Gerinnungssystems und einer erhöhten vaskulären Sensitivität auf pressorisch

wirksame Substanzen wie Angiotensin II.²³³ Eine Reihe von Untersuchungsbefunden spricht dafür, dass zirkulierende Faktoren für diese Endothelzelldysfunktion verantwortlich sind.²³⁸ Wir konnten zeigen, dass Serum von Präeklampsiepatientinnen auf kultivierten endothelialen Zellen aus humanen Nabelschnurvenen zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 Adhäsionsmolekülen führt, verbunden mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.²³⁹ Dieser Effekt war nach der Geburt nicht mehr nachweisbar. Weiterhin beobachteten wir, dass Serum von Präeklampsiepatientinnen die Permeabilität endothelialer Zellkulturen für Albumin erheblich steigert.²⁴⁰ Auch dieser Effekt war postpartal signifikant vermindert. Serum von normotensiven Schwangeren, schwangeren Frauen mit essentieller Hypertonie, altersentsprechenden Patientinnen mit essentieller Hypertonie und gesunden nicht schwangeren Frauen hatten keinen Einfluss auf die endotheliale Permeabilität und die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle. Bei der Suche nach dafür verantwortlichen zirkulierenden Faktoren konzentrierten wir uns nachfolgend auf ebenfalls seit längerem diskutierte immunologische Mechanismen in der Pathogenese der Präeklampsie.²⁴¹ Ausgehend von der Beobachtung, dass Patientinnen mit primärer Hypertonie in einem relativ hohen Prozentsatz agonistisch wirksame Autoantikörper gegen Alpha-1-Rezeptoren entwickeln, testete unsere Arbeitsgruppe die Hypothese, dass Präeklampsiepatientinnen funktionell wirksame Antikörper gegen vaskuläre Hormonrezeptoren bilden. Da eine erhöhte vaskuläre Sensitivität gegenüber Angiotensin II typisch für die Entwicklung einer Präeklampsie ist,²¹⁸ waren Angiotensin II-Rezeptoren von vorrangigem Interesse. Mittels des Bioassays der spontanpulsierenden kultivierten neonatalen Rattenherzmuskelzellen, Westernblot und konfokaler Mikroskopie konnten wir zeigen, dass Immunglobuline von Patientinnen mit Präeklampsie einen Faktor enthalten, der den Angiotensin AT1-Rezeptor stimuliert.²⁴²

In der initialen Studie wurden 25 Patientinnen mit Präeklampsie (erstmaliges Auftreten einer arteriellen Hypertonie > 140/90 mmHg und einer Proteinurie > 300

mg/l im 24-h-Urin) untersucht. Die Studie zeigte, dass die Immunglobulinfraktion von Patientinnen mit Präeklampsie einschließlich HELLP-Syndrom Antikörper enthält, die an den Angiotensin-1-Rezeptor binden. Diese Antikörper wirken agonistisch, d. h. sie aktivieren den AT1-Rezeptor. Nach Entbindung ist eine rasche Verminderung der Antikörperaktivität zu beobachten. Affinitätschromatographische Reinigung und Inkubation mit antihumanem IgG- und IgM-Antikörpern belegen, dass es sich um einen IgG-Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor handelt. Die Untersuchungsergebnisse mit Peptidsequenzen der 2. Schleife des Rezeptors sprechen dafür, dass diese die Bindungsstelle für den Antikörper enthält. Mittels kurzer überlappender Peptide dieser 2. Schleife konnte die Aminosäuresequenz AFHYESQ als Bindungsstelle bestimmt werden. Bei einigen Präeklampsiepatientinnen war zusätzlich ein geringer agonistisch wirksamer Antikörpereffekt gegen den Alpha-1-Rezeptor nachweisbar, ebenso wie bei schwangeren Patientinnen mit einer präexistenten essentiellen Hypertonie. Dieser Befund entsprach Untersuchungsergebnissen, wie wir sie bei Patientinnen mit essentieller Hypertonie beschrieben hatten. Doch konnten wir bei keiner schwangeren Patientin mit unkomplizierter essentieller Hypertonie Antikörper gegen den Angiotensin-1-Rezeptor nachweisen. Die mittels des Bioassays der spontanpulsierenden Rattenherzmuskelzellen gewonnenen Befunde zur Identifizierung von Antikörpern gegen den AT1-Rezeptor wurden durch Westernblot und konfokale Mikroskopie an vaskulären glatten Muskelzellen bestätigt. Die durch den AT1-Antikörper vermittelte intrazelluläre Signalübertragung war durch den PKC-Inhibitor Calphoszin C vollständig zu inhibieren, was für die Involvierung der Proteinkinase C in die Zellaktivierung spricht. Die dargestellten Befunde stützen die Hypothese, dass Autoantikörper gegen Angiotensin-1-Rezeptoren eine Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie spielen.

2.4.2 Fragestellung

Ziel der Untersuchungen ist:

- der biochemischer Nachweis einer Bindung der Auto-Antikörper direkt an den AT1-Rezeptor (Co-Immunopräzipitation)
- die Untersuchung der Signaltransduktion in primären humanen glatten Muskelzellen und Trophoblasten
- die Induktion der NADPH-Oxidase durch die Autoantikörper, was zu einer intrazellulären Sauerstoffradikal-Freisetzung führt
- die Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch die Autoantikörper
- die Expression eines NF- κ B-und AP-1-regulierten Gens, nämlich Tissue Faktor
- die Expression von NADPH-Oxidase, Sauerstoffradikalen, NF- κ B und Tissue Faktor in der Plazenta von gesunden und präeklampsischen Patientinnen

2.4.3 Ergebnisse

2.4.3.1 Aktivierung des Tissue Faktors

Unsere Vorarbeiten haben gezeigt, dass die gereinigten Autoantikörper (AT1-AA) funktionell an den AT1-Rezeptor binden. Als erstes haben wir durch eine biochemische Methode (Co-Immunopräzipitation) die Bindung zwischen Autoantikörper und Rezeptor bestätigt. Wir konnten ein Extrakt aus glatten Muskelzellen nach Präzipitation mit einem AT1-Rezeptor-Antikörper erfolgreich mit den Autoantikörpern detektieren. Der umgekehrte Ansatz, die Präzipitation mit den Autoantikörpern und die anschließende Detektion mit einem kommerziellen Antikörper gegen den AT1-Rezeptor war ebenfalls erfolgreich. Autoantikörper von Patientinnen mit Präeklampsie, die nicht an die spezifische Säule mit dem AT1-Rezeptor-Peptid (ns IgG) binden, können keine Co-Immunopräzipitation mit dem AT1-Rezeptor hervorrufen.

Als nächstes haben wir die Signaltransduktion der AT1-AA in glatten Muskelzellen untersucht. Wir konnten eine p42/p44 MAP-Kinase-Aktivierung durch Ang II und die

AT1-AA nachweisen, die durch den AT1-Rezeptor-Blocker Losartan blockiert werden konnte. Anschließend haben wir die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 aktiviert. AT1-AA und Ang II aktivieren AP-1, was durch Losartan inhibiert werden konnte. Durch Supershift-Analyse mit Antikörpern gegen c-jun und Kompetition mit nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotiden konnten wir die Spezifität des Elektro-Mobility-Shift-Assay nachweisen. IgG-Präparationen von gesunden Schwangeren (npIgG) und IgG-Präparationen von präeklampsischen Patientinnen, die nicht die spezifische Fraktion (nslgG) enthalten, zeigen keinen Effekt auf p42/p44-MAP-Kinase-Aktivierung, sowie auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1.

Als wichtiges AP-1- und NF- κ B-reguliertes Protein haben wir den Einfluss der AT1-AA auf den Tissue Faktor untersucht. Als erstes haben wir mittels Luciferase-Untersuchungen zeigen können, dass AT1-AA und Ang II den Tissue Faktor-Promoter in glatten Muskelzellen aktivieren. Eine Mutation, die die AP-1- und NF- κ B-Bindungsstelle deletiert, verhindert den Effekt von Ang II und AT1-AA. In CHO-Zellen, die keinen AT1-Rezeptor besitzen, zeigen AT1-AA und Ang II ebenfalls keine Aktivierung des Tissue Faktor-Promoters. Wird jedoch der AT1-Rezeptor stabil in CHO Zellen transfiziert, ist die Tissue Faktor-Aktivierung durch AT1-AA und Ang II erneut nachweisbar. Diese Aktivierung ist durch Losartan blockierbar. In beiden Zellen haben np IgG und ns IgG keinen Einfluss auf den Tissue Faktor-Promoter. Parallel zur Expression des Tissue Faktor-Promoters haben wir die Tissue Faktor-Aktivität gemessen. AT1-AA und Ang II, nicht aber np IgG und ns IgG, erhöhten die Tissue Faktor Aktivität in glatten Muskelzellen. Somit konnten wir zeigen, dass die Expression und die Aktivität des Tissue Faktors parallel sind.

Dann haben wir die Expression und Aktivität des Tissue Faktors in den Plazenten von gesunden Schwangeren und präeklampsischen Patientinnen untersucht. Sowohl die Expression als auch die Aktivität des Tissue Faktors sind in den präeklampsischen Plazenten erhöht. Die Expression ist vor allem in Trophoblasten und in Gefäßen in den präeklampsischen Plazenten erhöht, doch zeigen auch die

Gefäße in unauffälligen Plazenten eine geringe Tissue Faktor-Expression.

In dieser Arbeit haben wir mit einer biochemischen Methode zeigen können, dass AT1-AA direkt an den AT1-Rezeptor binden. AT1-AA induzieren eine p22/p42 MAP-Kinase-Aktivierung. Weiterhin erhöhen die AT1-AA die DNA-Bindungsaktivität von AP-1. Der Tissue Faktor-Promoter wurde durch die AT1-AA aktiviert. Die Aktivierung des Tissue Faktor-Promoters ist abhängig von der Intaktheit der AP-1 und NF- κ B im Promoter und der Präsenz des AT1-Rezeptors. Die Expression und die Aktivität des Tissue Faktor ist erhöht in den Plazenten von präeklampsischen Patientinnen.

2.4.3.2 Reprint Paper P8

Dechend R, V Homuth, G Wallukat, J Kreuzer, JK Park, J Theuer, A Juepner, DC

Gulba, N Mackman, H Haller, FC. Luft

AT1 Receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to
express tissue factor

Circulation 2000 ;101:2382-2387

2.4.3.3 Aktivierung der NADPH-Oxidase und redoxsensitive Signaltransduktion

In der jetzigen Arbeit haben wir die in vitro-Effekte der über die spezifische Säule gereinigten Autoantikörper (AT1-AA) untersucht und begonnen, in vitro mögliche relevante Signaltransduktionswege aufzuzeigen, die in der Pathophysiologie der Präeklampsie eine wichtige Rolle spielen könnten. AT1-AA induzieren intrazelluläre Sauerstoffradikalfreisetzung, gemessen mit der DCF-Methode. Der Effekt ist dem von Angiotensin II vergleichbar. Die beiden Kontrollen, IgG von gesunden Schwangeren (np IgG) und die IgGs von den Präekampsiepatientinnen, die nicht an unsere spezifische Säule binden (ns IgG), haben keinen induzierenden Effekt. Durch die Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren lässt sich zeigen, dass der Effekt der AT1-AA AT-1-Rezeptor-vermittelt ist (Hemmung durch Losartan), dass Superoxiddismutase den Effekt aufhebt und dass Cox-2 (Indometacin hat keinen Effekt), die Xanthinoxidase (kein Effekt durch Allopurinol) und NOS nicht involviert sind. Diphenyliumjodid (DPI), ein Hemmstoff für Flavin-haltige Oxidasen, deren wichtigster Vertreter die NADPH-Oxidase ist, hemmt einen bedeutenden (signifikanten) Anteil der AT1-AA-induzierten intrazellulären Sauerstoff (ROS)-Generation. Da es keinen spezifischen Inhibitor für die NADPH-Oxidase gibt, haben wir über Antisense-Technik eine der Untereinheiten der NADPH-Oxidase (p22 phox) funktionell blockiert und sehen die gleichen Effekte wie bei DPI, nämlich eine signifikante, aber nicht komplette Hemmung der ROS-Generation. Neben den glatten Muskelzellen, die in einer normalen Schwangerschaft in der Plazenta zerstört werden, bei der Präeklampsie jedoch persistieren, spielen Trophoblasten eine wichtige Rolle in der Präeklampsieentstehung. Bevor wir testen konnten, welchen Effekt die AT1-AA auf Trophoblasten haben, mussten wir erst nachweisen, ob primäre humane Trophoblasten ein lokales Renin-Angiotensin-System exprimieren. Den Nachweis haben wir mittels quantitativer PCR (Taq-Man) erbracht und gefunden, dass Trophoblasten während jedes Stadiums der Differenzierung alle 5 Komponenten des lokalen Renin-Angiotensin-Systems exprimieren. Zu unserer Überraschung war die Expressionsstärke, verglichen mit primären humanen

Adipozyten, wo die Bedeutung eines lokalen RAS mittlerweile etabliert ist, deutlich höher. Als nächstes haben wir zeigen können, dass auch Trophoblasten mit einer vermehrten intrazellulären ROS-Freisetzung auf AT1-AA und Ang II reagieren, jedoch in der Quantität geringer als VSMC. Durch partielle Hemmbarkeit des Effektes durch DPI gab es erneut Hinweise, dass die NADPH-Oxidase ein wichtiges Glied in der Signaltransduktionskaskade ist. In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass AT1-AA, nicht jedoch ns IgG und np IgG die NADPH-Oxidase-Untereinheiten p22 phox (membranständig), p47 phox und p67 phox (zytosolisch) in VSMC und Trophoblasten induzieren. Als wichtigen redox-regulierten Transkriptionsfaktor, der Inflammation, aber auch Apoptose und Proliferation reguliert, haben wir NF- κ B in beiden Zelltypen angeschaut. AT1-AA induzieren in beiden Zellen NF- κ B. Durch Supershift mit p50 und p65 konnten wir zum einen die Spezifität des Bandshifts demonstrieren, zum anderen die relevanten Untereinheiten der NF- κ B-Familie identifizieren. Losartan und DPI hemmen die AT1-AA-induzierte NF- κ B-Freisetzung.

Diese interessanten in vitro-Befunde haben wir auf die ex vivo-Situation an der präeklampischen Plazenta zu übertragen versucht. Wir haben mittels Immunohistochemie, Western-Blot und Taq-Man Untersuchungen gezeigt, dass die bereits vorher untersuchten Untereinheiten der NADPH-Oxidase, p22, p47 und p67 phox, in der präeklampischen Plazenta vermehrt exprimiert werden, während ihre Expression in der gesunden Plazenta nur sehr gering ist. Ebenso ist die Expression von intrazellulären Sauerstoffradikalen in der Präeklampsie deutlich höher als in der gesunden Plazenta. Gemessen haben wir die ROS mit der oxidativen Fluoreskopie (Dihydroethidin). Um zu zeigen, dass auch in der Plazenta VSMC und Trophoblasten die maßgeblichen Produzenten der Sauerstoffradikalen sind, haben wir eine Co-Lokalisation für den Trophoblasten-Marker (Cytokeratin 7) und p22 phox sowie in seriellen Schnitten die oxidative Fluoreskopie und smooth-muscle- α -actin Färbung durchgeführt. Parallel zu den Experimenten haben wir zeigen können, dass NF- κ B in

der präeklampsischen Plazenta vermehrt aktiv ist (Bandshift) und vermehrt exprimiert wird (Immunohistochemie mit einem Antikörper, der nur aktiviertes p65 erkennt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir interessante und potentiell wichtige in vitro Effekte an primären humanen VSMC und Trophoblasten der gereinigten Autoantikörper aufzeigen konnten. Diese beinhalten die intrazelluläre Sauerstofffreisetzung, die Aktivierung der NADPH-Oxidase und die konsekutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Diese Effekte sind bisher in der Präeklampsie noch nicht beschrieben worden.

Deshalb haben wir in einem zweiten Schritt untersucht und gefunden, dass in der präeklampsischen Plazenta Sauerstoffradikale, NADPH-Oxidase und NF- κ B deutlich erhöht sind im Vergleich zur gesunden Plazenta. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Autoantikörper gegen den AT-1 Rezeptor in die Pathophysiologie der Präeklampsie involviert sind. Einen Beweis können wir mit dieser Arbeit jedoch nicht liefern, dazu sind weitere Studien nötig. So testen wir die Autoantikörper zur Zeit im Tiermodell, und seit 4 Monaten werden Patientinnen mit einer schweren Präeklampsie in einer ersten Pilotstudie einer Immunadsorption unterzogen.

2.4.3.4 Reprint Paper P9

Dechend R, Viedt C , Müller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V , Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC
AT₁ receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH-

Oxidase

Circulation, 2003 1;107:1632-9.

2.4.3.5 Reprint Editorial

Zu dieser Arbeit ist in der gleichen Ausgabe der Zeitschrift „Circulation“ ein Editorial erschienen.

Editorial

zu der Arbeit von Dechend et al.: Circulation 2000 ;101:2382-2387

Von

James M. Roberts

Angiotensin-1 Receptor Autoantibodies -A Role in the Pathogenesis of
Preeclampsia?

2.4.4 Diskussion und Ausblick

Das Krankheitsbild der Präeklampsie ist mit ausgeprägten Veränderungen im Renin-Angiotensin-System verbunden, die sich vorwiegend in einer Verminderung der Plasmapreninaktivität und einer erhöhten pressorischen Angiotensin II-Sensitivität äußern.²³³ Aus letzterer resultiert der Angiotensin-Sensitivitätstest als Prädiktor für die Entwicklung einer Präeklampsie. Eine spezifische Überempfindlichkeit auf Angiotensin II wurde an isolierten Widerstandsgefäßen von Frauen mit Präeklampsie dokumentiert. Im Einklang damit steht die Beobachtung, dass Thrombozyten von Präeklampsiepatientinnen im Vergleich zur normotonen Schwangerschaft mit gesteigerter intrazellulärer Kalziumfreisetzung auf Angiotensin II reagieren.²⁴³ Mit der erhöhten Angiotensin II-Sensitivität gehen fallende Angiotensin II-Plasmakonzentrationen einher, die wiederum für eine verminderte Produktion vasodilatatorisch wirksamer Prostanoiden verantwortlich sein könnten.²⁴⁴ Insbesondere die Hochregulation von Angiotensin II-Rezeptoren,²⁴⁵ nachgewiesen mittels Angiotensin II-Bindungsstudien an Thrombozyten, könnte die verstärkte Angiotensin II-Blutdruckreaktion bei Präeklampsiepatientinnen erklären.²⁴⁶

Im fetoplazentaren Kreislauf wurden bei Präeklampsie divergierende Befunde zur mütterlichen Zirkulation erhoben. Normale und erhöhte Spiegel von Komponenten des RAS in Plazenta und fetalen Geweben sind wahrscheinlich Ausdruck der Aktivierung des lokalen RAS infolge der plazentaren Minderperfusion.²⁴⁷ Ebenso steht die verminderte plazentare Expression von Angiotensin-AT1-Rezeptoren im Gegensatz zu den mütterlichen Befunden, kann aber als sekundäre Herabregulation bei aktiviertem plazentarem RAS interpretiert werden.²⁴⁸ Diese Befunde stehen im Einklang damit, dass eine verminderte plazentare Perfusion eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie spielt.²⁴⁹ Weitere Hinweise dafür, dass das Renin-Angiotensin-System in die Pathogenese der Präeklampsie involviert ist, liefern genetische Untersuchungen.²⁵⁰ So konnte bei Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu normotonen Schwangeren eine Variation auf dem Angiotensin-Gen-Lokus nachgewiesen werden, die auch bei Patientinnen mit essentieller Hypertonie

assoziiert zu sein scheint. Es handelt sich dabei um die M235T-Variante des Angiotensinogen-Gens, die durch den Einbau von Threonin anstelle von Metionin als 235. Aminosäure im Angiotensinogenmolekül gekennzeichnet ist.²³³ Eine vermehrte lokale Expression von Angiotensinogen in uterinen Spiralarterien könnte ebenfalls für die Entwicklung einer Präeklampsie bedeutsam sein. Darauf weisen Untersuchungsbefunde hin, die in dezidualen Spiralarterien von Angiotensinogen-T235M-heterozygoten schwangeren Frauen im 1. Trimenon eine erhöhte Expression der T235-Angiotensinogenvariante fanden.²²⁹ Daraus ableitbare Störungen von physiologischen schwangerschaftsspezifischen Umbauprozessen der Spiralarterien könnten die Entwicklung einer Atheromatose mit konsekutiver plazentarer Hypoxie initiieren.²²³ Der Angiotensin II-AT1-Rezeptor-Genotyp war ebenfalls Gegenstand molekulargenetischer Untersuchungen zur Genese der Präeklampsie. Bisher fand sich kein Anhalt dafür, dass Polymorphismen des mütterlichen AT1-Rezeptors mit einer Präeklampsie assoziiert sind.²⁵¹ Möglicherweise spielen aber Polymorphismen des AT1-Rezeptors auf der fetalen Seite eine Rolle für die Ätiologie der Präeklampsie.

Gegen Rezeptoren gerichtete Autoantikörper sind bei verschiedenen Krankheitsbildern bedeutsam, wie z. B. bei Myasthenia gravis pseudoparalytica oder Morbus Basedow. Diese Antikörper können agonistisch wirken. So stimulieren bei Morbus Basedow Antikörper gegen den TSH-Rezeptor spezifisch die Schilddrüsenaktivität. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden Autoantikörper gegen adrenerge Beta-1-Rezeptoren nachgewiesen.²⁵² Bei Patienten mit essentieller Hypertonie fanden wir agonistisch wirksame Antikörper gegen Alpha-1-Rezeptoren. Für die klinische Relevanz der Autoantikörper gegen vaskuläre Hormonrezeptoren spricht die Beobachtung, dass die Entfernung von Antikörpern gegen Beta-1-Rezeptoren mittels Immunadsorption bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zu einer deutlichen Besserung der Herzfunktion führte.^{253,254} Unsere Bindungsstudien sprechen dafür, dass die Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor gegen die 2. extrazelluläre Schleife des Rezeptors gerichtet sind und

diesen, in ähnlicher Weise wie sein natürlicher Agonist Angiotensin II, aktivieren. In der Pathogenese der Präeklampsie werden seit langem auch immunologische Mechanismen postuliert. So sprechen erhöhte Spiegel von TNFa im Plasma und Fruchtwasser von Patientinnen mit Präeklampsie für eine abnormale Aktivierung des Immunsystems.²⁵⁵ Im Einklang damit steht der Nachweis von Interleukin II in Deziduazellen von Patientinnen mit Präeklampsie. Autoantikörper gegen Phospholipide oder Throphoblastenbestandteile sprechen dafür, dass Autoimmunmechanismen eine Rolle für die Genese der Präeklampsie spielen können.²⁵⁵ Wir wissen nicht, welche Mechanismen zur Bildung von Antikörpern gegen den AT1-Rezeptor bei Präeklampsie führen. Der AT1-Rezeptor scheint bei der Präeklampsie hochreguliert zu sein. Verschiedene Untersuchungsbefunde sprechen dafür, dass zirkulierende Faktoren bei Präeklampsie zu einer ausgeprägten Aktivierung von Endothelzellen führen.²⁵⁶ So auch zu einer starken Erhöhung der endothelialen Permeabilität, wie von uns beschrieben. Wahrscheinlich gehören die Autoantikörper gegen AT1-Rezeptoren zu diesen zirkulierenden Faktoren, da auch Angiotensin II einen permeabilisierenden Effekt auf Endothelzellen hat. Wir wissen aber nicht, welche Mechanismen zur Bildung der Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor führen. Vorstellbar ist, dass die mit dem Krankheitsbild verbundene plazentare Hypoperfusion zu einer veränderten AT1-Rezeptor-Expression führt, die die Bildung von Autoantikörpern stimuliert.

Ebenso ist die klinische Relevanz der Autoantikörper gegen AT1-Rezeptoren bisher noch ungeklärt. Behandlungsmöglichkeiten zur Verlängerung der Schwangerschaft, insbesondere unter dem Aspekt der Verbesserung der kindlichen Prognose beim Auftreten der Präeklampsie vor der 30. Schwangerschaftswoche, könnten daraus resultieren. Vorstellbar sind Strategien zur Entfernung der Autoantikörper, wie das Blutauswaschverfahren, die Plasmapharese oder spezifische Immunadsorption, die Anwendung von Glukokortikoiden zur Suppression des Antikörpereffektes, ein vermehrter Katabolismus der Autoantikörper durch Gabe von Immunglobulinen, oder die Anwendung von niedermolekularem Heparin zur Minderung prokoagulatorischer

Effekte der Antikörper. Die vom Wirkmechanismus sich anbietende Anwendung von AT1-Rezeptor-Antagonisten ist in der Schwangerschaft streng kontraindiziert, wäre aber bei postpartalen Formen der Präeklampsie und des HELLP-Syndroms ebenfalls denkbar

Das Auftreten einer Präeklampsie ist an das Vorhandensein einer Plazenta gebunden.²²³ Klassischerweise wird eine gestörte Plazentaentwicklung als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung des klinischen Krankheitsbildes angesehen. Ausgehend von einer fehlimplantierten und/oder unterversorgten Plazenta käme es zu einer Freisetzung von Partikeln oder Substanzen in die mütterliche Zirkulation, die zu einer generalisierten Endothelzellaktivierung bzw. Endothelzellschädigung führen.²¹⁷ Folgen der endothelialen Schädigung sind u.a. ein generalisierter Vasospasmus, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität sowie eine disseminierte Aktivierung der Gerinnungskaskade. Welche zirkulierenden Faktoren die endotheliale Schädigung vermitteln, ist ebenso wenig geklärt wie ihr genauer Ursprung. Die Liste von Kandidaten umfaßt u.a. zytotoxische Zytokine, reaktive Sauerstoffmetabolite und Lipidperoxidationsprodukte, Trophoblastmembranpartikel sowie Antikörper bzw. zirkulierende Immunkomplexe.²¹⁷

Wir haben festgestellt, dass Schwangere mit Präeklampsie spezifische agonistische Antikörper gegen den Angiotensin-II-AT1-Rezeptor (AT1-AA) entwickeln. Dieser Autoantikörper ist gegen die zweite extrazelluläre Schleife des AT1-Rezeptors gerichtet. Vorläufige Untersuchungen deuten darauf hin, dass er um die 20. SSW erscheint und 4-8 Wochen nach der Entbindung wieder verschwindet. Ähnliche aktivierende Autoantikörper wurden auch bei Patientinnen mit maligner Hypertonie nachgewiesen. Bei Patientinnen mit Präeklampsie sind bereits andere Autoantikörper nachgewiesen worden, u.a. gegen Endothelzellen und Gerinnungsfaktoren, denen eine mögliche Rolle bei der Entstehung des klinischen Krankheitsbildes zugeschrieben wurde.

Für den von uns beschriebenen AT1-AA konnten wir u.a. zeigen, dass er in vitro eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB bewirkt und die Freisetzung

des Tissue Faktors aus glatten Gefäßmuskelzellen fördert, womit er u.a. eine Aktivierung der Gerinnungskaskade hervorrufen könnte. In einem weiteren Schritt konnten wir zeigen, dass AT1-AA in glatten Gefäßmuskelzellen und in Trophoblasten in vitro die Generation von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS) induzieren und dass dieser Prozess über die NADPH-Oxidase vermittelt ist. Ein vermehrter Anfall von ROS bzw. ein Überschreiten der mütterlichen Neutralisationskapazität für ROS wird als ein wesentlicher endothelialer Schädigungsmechanismus bei Präeklampsie diskutiert. Präeklampsische Plazenten weisen eine stärkere Produktion von ROS auf als gesunde Kontrollplazenten. Wir konnten zeigen, dass in Trophoblasten präeklampsischer Plazenten eine vermehrte Expression der NADPH-Oxidase stattfindet und dass glatte Gefäßmuskelzellen an der vermehrten Freisetzung von ROS in diesen Plazenten ebenfalls beteiligt sind. Gleichzeitig konnten wir nachweisen, dass in Trophoblasten und in glatten Gefäßmuskelzellen präeklampsischer Plazenten vermehrt Tissue Faktor exprimiert wird. Ob diese Befunde u.a. durch eine spezifische Bindung von AT1-AA an Trophoblasten und/oder glatte Gefäßmuskelzellen vermittelt werden, ist derzeit noch nicht untersucht.

Der Gold-Standard zum Nachweis der AT1-AA beruht derzeit auf einem Bio-Assay mit isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten, die bei Vorhandensein des AT1-AA eine erhöhte Kontraktilität zeigen. Wir entwickeln derzeit einen spezifischen AT1-AA-ELISA, um den klinischen Nachweis der AT1-AA zu erleichtern.

Eine Therapie mit AT-1 Blockern in der Schwangerschaft ist auf Grund der fetalen Nierenentwicklung kontraindiziert. Eine therapeutische Entfernung der AT1-Antikörper ist jedoch mittels Immunadsorption möglich. Immunadsorptionsverfahren dienen der Entfernung von Antikörpern und sind erfolgreich bei immunologisch bedingten Krankheitsbildern eingesetzt worden, vereinzelt auch in der Schwangerschaft. Unsere Hypothese ist, dass die Entfernung der AT1-Antikörper zu einer Besserung der klinischen Symptomatik, zumindest zu einer Progredienzverzögerung führt. Damit wäre eine Verlängerung der Schwangerschaft möglich und eine deutliche Verbesserung der kindlichen Überlebenschancen zu

erreichen, insbesondere bei einem Auftreten der Präeklampsie vor der 30. Schwangerschaftswoche. Eine Studie ist in Planung, in der wir bei Patientinnen, die eine Präeklampsie vor der 30. Schwangerschaftswoche entwickeln, eine antikörperbasierte Immunadsorption zur Entfernung der AT1-Antikörper durchführen. Geprüft werden soll die Hypothese, dass eine spezifische Immunadsorption mittels antikörperbasierter Immunapharese zusätzlich zur Standardtherapie zur Verbesserung der mütterlichen und kindlichen Prognose führt (Morbidität und Mortalität).

Literaturverzeichnis

1. Henzen C. [Risk factors for arteriosclerosis]. Schweiz Rundsch Med Prax. 2001;90:91-5.
2. Frohlich J, Dobiasova M, Lear S, Lee KW. The role of risk factors in the development of atherosclerosis. Crit Rev Clin Lab Sci. 2001;38:401-40.
3. Simon AC, Levenson JA, Safar ME. Systolic hypertension: differences of mechanism according to age and possible application to treatment. Eur Heart J. 1982;3 Suppl C:65-9.
4. Ferdinand KC. Update in pharmacologic treatment of hypertension. Cardiol Clin. 2001;19:279-94, v.
5. Leopold JA, Loscalzo J. Clinical importance of understanding vascular biology. Cardiol Rev. 2000;8:115-23.
6. Frohlich ED. Hypertension: our major challenges. Hypertension. 2001;38:990-1.
7. Bohm M, Castellano M, Agabiti-Rosei E, Flesch M, Paul M, Erdmann E. Dose-dependent dissociation of ACE-inhibitor effects on blood pressure, cardiac hypertrophy, and beta-adrenergic signal transduction. Circulation. 1995;92:3006-13.
8. Frankel DH. Mechanism-based medicine proposed for hypertension. Lancet. 1996;347:1473.
9. Smith D. Cardiovascular disease: a historic perspective. Jpn J Vet Res. 2000;48:147-66.
10. Savage DD, Watkins LO, McGee DL. A mechanism for the development of fixed primary (essential) hypertension: insights from population-based studies using echocardiography. Clin Cardiol. 1989;12:IV23-9.
11. Ferrario CM, Smith R, Levy P, Strawn W. The hypertension-lipid connection: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis. Am J Med Sci. 2002;323:17-24.
12. Hanke H, Lenz C, Finking G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review. Acta Chir Belg. 2001;101:162-9.
13. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993;362:801-9.
14. Dzau VJ. Mechanism of the interaction of hypertension and hypercholesterolemia in atherogenesis: the effects of antihypertensive agents. Am Heart J. 1988;116:1725-8.
15. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis. Int J Cardiol. 1997;62 Suppl 2:S23-9.
16. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. Circ J. 2002;66:529-33.
17. Chesebro JH, Rauch U, Fuster V, Badimon JJ. Pathogenesis of thrombosis in coronary artery disease. Haemostasis. 1997;27 Suppl 1:12-8.

18. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:330-5.
19. Ridker PM. Inflammation, infection, and cardiovascular risk: how good is the clinical evidence? [editorial; comment]. *Circulation.* 1998;97:1671-4.
20. Aviram M. Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. *Antioxid Redox Signal.* 1999;1:585-94.
21. Nickenig G, Strehlow K, Baumer AT, Baudler S, Wassmann S, Sauer H, Bohm M. Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT1 receptor gene expression. *Br J Pharmacol.* 2000;131:795-803.
22. Ross R. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol.* 1993;143:987-1002.
23. Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caligiuri G, Kol A, Sperti G, Cianflone D, Maseri A. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1997;80:10e-16e.
24. Farmer JA, Torre-Amione G. Atherosclerosis and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2002;4:92-8.
25. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25 Suppl 2:S9-12.
26. Tegos TJ, Kalodiki E, Sabetai MM, Nicolaides AN. The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. *Angiology.* 2001;52:89-98.
27. Najemnik C, Sinzinger H, Kritz H. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca.* 1999;26:148-53.
28. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1591-601.
29. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
30. DiMario JX. Activation and repression of growth factor receptor gene transcription (Review). *Int J Mol Med.* 2002;10:65-71.
31. Barton M, Haudenschild CC. Endothelium and atherogenesis: endothelial therapy revisited. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38 Suppl 2:S23-5.
32. Regitz-Zagrosek V, Auch-Schwelk W, Hess B, Klein U, Duske E, Steffen C, Hildebrandt AG, Fleck E. Tissue- and subtype-specific modulation of angiotensin II receptors by chronic treatment with cyclosporin A, angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT1 antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:66-72.
33. Libby P. What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J Cardiol.* 2001;88:3J-6J.
34. Kolloch RE. [Hypertension 2001]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001;126:1321.
35. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J,

- Drexler H, Ferrari R, van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol.* 2001;88:1L-20L.
36. Colwell J. Pathogenesis of vascular disease. *Diabetes Obes Metab.* 2000;2 Suppl 2:S19-24.
 37. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 1997;81:970-6.
 38. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:E83-8.
 39. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation.* 1996;94:3090-7.
 40. Coste P. [Atherosclerosis. Pathologic anatomy, physiopathology, epidemiology and risk factors, prevention]. *Rev Prat.* 2001;51:85-91.
 41. Gavornik P, Galbavy S. Clinical picture of arteriolosclerosis. *Bratisl Lek Listy.* 2001;102:326-31.
 42. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts [see comments]. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:1359-75.
 43. Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension [published erratum appears in *Lancet* 1993 Aug 21;342(8869):504] [see comments]. *Lancet.* 1993;341:1447-51.
 44. Norwitz ER, Repke JT. Preeclampsia prevention and management. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7:21-36.
 45. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2000;47:38-48.
 46. Morgan T, Ward K. New insights into the genetics of preeclampsia. *Semin-Perinatol.* 1999;23:14-23.
 47. Dekker GA, Robillard PY, Hulsey TC. Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies. *Obstet-Gynecol-Surv.* 1998;53:377-82.
 48. Sibai BM, Lindheimer M, Hauth J, Caritis S, VanDorsten P, Klebanoff M, MacPherson C, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Dombrowski M. Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N-Engl-J-Med.* 1998;339:667-71.

49. Burley SK, Kamada K. Transcription factor complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12:225-30.
50. Scheidereit C. Transcription factors: important tools and targets for molecular medicine. *J Mol Med.* 1996;74:707-9.
51. Emery JG, Ohlstein EH, Jaye M. Therapeutic modulation of transcription factor activity. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:233-40.
52. Stenoien DL, Simeoni S, Sharp ZD, Mancini MA. Subnuclear dynamics and transcription factor function. *J Cell Biochem Suppl.* 2000;Suppl 35:99-106.
53. Liou HC, Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:477-87.
54. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription [see comments]. *Faseb J.* 1996;10:709-20.
55. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79.
56. Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF- $\{\kappa\}$ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood.* 2003.
57. Eliopoulos AG, Stack M, Dawson CW, Kaye KM, Hodgkin L, Sihota S, Rowe M, Young LS. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene.* 1997;14:2899-916.
58. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 2001;107:3-6.
59. Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6367-78.
60. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell.* 1995;80:529-32.
61. Renard P, Raes M. The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutical strategies. *Cell Biol Toxicol.* 1999;15:341-4.
62. Ginn Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:346-61.
63. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996;87:13-20.
64. May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol.* 1997;8:63-73.
65. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.
66. Baeuerle PA. IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control [comment]. *Cell.* 1998;95:729-31.

67. Huguet C, Crepieux P, Laudet V. Rel/NF-kappa B transcription factors and I kappa B inhibitors: evolution from a unique common ancestor. *Oncogene*. 1997;15:2965-74.
68. Bours V, Villalobos J, Burd PR, Kelly K, Siebenlist U. Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature*. 1990;348:76-80.
69. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:52-8.
70. Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA, Thanos D. Mechanisms by which IkappaB proteins control NF-kappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:49-54.
71. Scheidereit C. Signal transduction. Docking IkappaB kinases [news; comment]. *Nature*. 1998;395:225-6.
72. Tran K, Merika M, Thanos D. Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5386-99.
73. Naumann M, Scheidereit C. Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *Embo J*. 1994;13:4597-607.
74. Naumann M, Wulczyn FG, Scheidereit C. The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. *Embo J*. 1993;12:213-22.
75. Rice NR, Ernst MK. In vivo control of NF-kappa B activation by I kappa B alpha. *Embo J*. 1993;12:4685-95.
76. Krappmann D, Hatada EN, Tegethoff S, Li J, Klippel A, Giese K, Baeuerle PA, Scheidereit C. The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. *J Biol Chem*. 2000;275:29779-87.
77. Akira S, Kishimoto T. NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol*. 1997;65:1-46.
78. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J*. 1995;9:899-909.
79. Nichols TC, Fischer TH, Deliargyris EN, Baldwin AS, Jr. Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol*. 2001;6:20-9.
80. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med*. 1996;74:749-69.
81. van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr*. 2001;86 Suppl 1:S121-7.
82. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001;107:255-64.

83. Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol*. 1997;82:297-304.
84. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor- kappaB binding site prevents myocardial infarction [see comments]. *Nat Med*. 1997;3:894-9.
85. Ritchie ME. Nuclear Factor-kappa B is selectively and markedly activated in Humans with Unstable Angina Pectoris. *Circulation*. 1998;98:1707-1713.
86. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*. 1996;97:1715-22.
87. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 1997;95:1532-41.
88. Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*. 1994;94:877-84.
89. Muller DN, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Haller H, Luft FC. Angiotensin-induced inflammation and novel approaches to treatment. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 2001;31:89-103.
90. Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol*. 1997;65:111-37.
91. Guo S, Wang W, Zhai Y. [Research progression of nuclear transcription factor-kappaB]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2000;29:379-80.
92. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int*. 2001;59:415-24.
93. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. 2000;35:193-201.
94. Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Zhang YK, Tani T, Hashimoto T, Yagi M, Miyazaki I, Yamamoto K. Hypoxia, but not reoxygenation, induces interleukin 6 gene expression through NF-kappa B activation. *Transplantation*. 1997;63:466-70.
95. Budunova IV, Perez P, Vaden VR, Spiegelman VS, Slaga TJ, Jorcano JL. Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. 1999;18:7423-31.

96. Soares MP, Muniappan A, Kaczmarek E, Koziak K, Wrighton CJ, Steinhauslin F, Ferran C, Winkler H, Bach FH, Anrather J. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis. *J Immunol.* 1998;161:4572-82.
97. Scheidereit C. Transcription factors: important tools and targets for molecular medicine [editorial]. *J Mol Med.* 1996;74:707-9.
98. Muller DN, Heissmeyer V, Dechend R, Hampich F, Park JK, Fiebeler A, Shagdarsuren E, Theuer J, Elger M, Pilz B, Breu V, Schroer K, Ganten D, Dietz R, Haller H, Scheidereit C, Luft FC. Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage. *Faseb J.* 2001;15:1822-4.
99. Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1470:M55-62.
100. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001;107:241-6.
101. Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dorken B, Scheidereit C. Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene.* 1999;18:943-53.
102. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med.* 2002;196:605-17.
103. Nishikori M, Maesako Y, Ueda C, Kurata M, Uchiyama T, Ohno H. High-level expression of BCL3 differentiates t(2;5)(p23;q35)-positive anaplastic large cell lymphoma from Hodgkin disease. *Blood.* 2003;101:2789-96.
104. Schmidt-Ullrich R, Aebischer T, Hulsken J, Birchmeier W, Klemm U, Scheidereit C. Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development.* 2001;128:3843-53.
105. Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, Montani V, Monaco F. [Nf-kB transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications]. *Clin Ter.* 2001;152:249-53.
106. Inoue J, Takahara T, Akizawa T, Hino O. Bcl-3, a member of the I kappa B proteins, has distinct specificity towards the Rel family of proteins. *Oncogene.* 1993;8:2067-73.
107. Kerr LD, Duckett CS, Wamsley P, Zhang Q, Chiao P, Nabel G, McKeithan TW, Baeuerle PA, Verma IM. The proto-oncogene bcl-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Dev.* 1992;6:2352-63.
108. Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, McKeithan TW, Scheidereit C. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B

- precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2489-93.
109. Michel F, Soler-Lopez M, Petosa C, Cramer P, Siebenlist U, Muller CW. Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the IkappaB protein family. *Embo J*. 2001;20:6180-90.
 110. Lenardo M, Siebenlist U. Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF-kappa B trans-activating factor. *Immunol Today*. 1994;15:145-7.
 111. Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev*. 1993;7:1354-63.
 112. Franzoso G, Bours V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kelly K, Siebenlist U. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature*. 1992;359:339-42.
 113. Watanabe N, Iwamura T, Shinoda T, Fujita T. Regulation of NFKB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation. *Embo J*. 1997;16:3609-20.
 114. Brasier AR, Lu M, Hai T, Lu Y, Boldogh I. NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence. *J Biol Chem*. 2001;276:32080-93.
 115. Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *Embo J*. 1999;18:4766-78.
 116. Caamano JH, Perez P, Lira SA, Bravo R. Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol*. 1996;16:1342-8.
 117. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*. 1993;72:729-39.
 118. Guan E, Wang J, Laborda J, Norcross M, Baeuerle PA, Hoffman T. T cell leukemia-associated human Notch/translocation-associated Notch homologue has I kappa B-like activity and physically interacts with nuclear factor-kappa B proteins in T cells. *J Exp Med*. 1996;183:2025-32.
 119. Pan J, McEver RP. Regulation of the human P-selectin promoter by Bcl-3 and specific homodimeric members of the NF-kappa B/Rel family. *J Biol Chem*. 1995;270:23077-83.
 120. Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol*. 2002;71:9-15.
 121. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men [see

- comments] [published erratum appears in N Engl J Med 1997 Jul 31;337(5):356]. N Engl J Med. 1997;336:973-9.
122. Mlot C. Chlamydia linked to atherosclerosis [news]. Science. 1996;272:1422.
 123. Marrie TJ. Chlamydia pneumoniae [editorial]. Thorax. 1993;48:1-4.
 124. Gibbs RG, Carey N, Davies AH. Chlamydia pneumoniae and vascular disease. Br J Surg. 1998;85:1191-7.
 125. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Lawrence RD, Lee MJ, Strandness ED, Wang SP. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery [see comments]. Circulation. 1995;92:3397-400.
 126. Gupta S, Leatham EW. The relation between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis [editorial]. Heart. 1997;77:7-8.
 127. Bartels C, Maass M, Bein B, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 1998;31:827-831.
 128. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Alakarppa H, Lounatmaa K, Surcel HM, Leinonen M, Kairaluoma MI, Saikku P. Immunohistochemical detection of Chlamydia pneumoniae in abdominal aortic aneurysms. Ann N Y Acad Sci. 1996;800:236-8.
 129. Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccio AL, Lee MJ, Grayston JT. Specificity of detection of Chlamydia pneumoniae in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. Am J Pathol. 1997;150:1785-90.
 130. Saikku P. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis--an update. Scand J Infect Dis Suppl. 1997;104:53-6.
 131. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor Robinson D. Detection and widespread distribution of Chlamydia pneumoniae in the vascular system and its possible implications. J Clin Pathol. 1996;49:102-6.
 132. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, Carlquist JF. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. Circulation. 1998;97:633-6.
 133. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA, Woods ML, Anderson JL. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol. 1996;27:1555-61.
 134. Taylor Robinson D. Chlamydia pneumoniae infection and coronary heart disease. Trials should assess whether antibiotics eliminate organism from atherosclerotic lesions [letter]. Bmj. 1997;315:1538.
 135. Numazaki K, Chiba S. Chlamydia pneumoniae infection and coronary heart disease. Role of C pneumoniae in pathogenesis of atherosclerosis must be

- determined [letter]. *Bmj*. 1997;315:1538.
136. Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology*. 1997;48:699-706.
 137. Shor A. Mechanism of Arterial Infection by *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation*. 2001;104:E75.
 138. Mahony JB, Coombes BK. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: does the evidence support a causal or contributory role? *FEMS Microbiol Lett*. 2001;197:1-9.
 139. Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr*. 2001;131:2798S-2804S.
 140. Girard SE, Temesgen Z. Emerging concepts in disease management: a role for antimicrobial therapy in coronary artery disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2:765-72.
 141. Gabrielli M, Santarelli L, Gasbarrini A. *Chlamydia pneumoniae* infection: which role in atherosclerosis? *Arch Intern Med*. 2002;162:2140; author reply 2141.
 142. Ngeh J, Gupta S. Inflammation, infection and antimicrobial therapy in coronary heart disease--where do we currently stand? *Fundam Clin Pharmacol*. 2001;15:85-93.
 143. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997;96:4095-103.
 144. Dugan JP, Feuge RR, Burgess DS. Review of evidence for a connection between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic disease. *Clin Ther*. 2002;24:719-35.
 145. Yla Herttuala S. Gene expression in atherosclerotic lesions. *Herz*. 1992;17:270-6.
 146. Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation*. 2001;103:351-6.
 147. Pedersen TR. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy after AMI. *Am Heart J*. 1999;138:177-82.
 148. Leowattana W. Chronic infections and atherosclerosis. *J Med Assoc Thai*. 2001;84 Suppl 3:S650-7.
 149. Riccioni G, De Santis A, Cerasa V, Menna V, Di Ilio C, Schiavone C, Ballone E, D'Orazio N. Atherosclerotic plaque formation and risk factors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2003;16:25-31.
 150. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G. Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res*. 2002;53:911-20.
 151. Phillips JI, Shor A. Association between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic lesions. *Cardiovasc J S Afr*. 2001;12:42-6.

152. Gabay MP, Jain R. Role of antibiotics for the prevention of cardiovascular disease. *Ann Pharmacother*. 2002;36:1629-36.
153. Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, Gulba DC. Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI- 1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation*. 1999;100:1369-73.
154. Grayston JT. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Rev Med Interne*. 1996;17 Suppl 1:45s-47s.
155. Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis*. 1998;177:725-9.
156. Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, Kano S, Shimada K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine*. 1994;6:87-91.
157. Liu L, Hu H, Ji H, Murdin AD, Pierce GN, Zhong G. Chlamydia pneumoniae infection significantly exacerbates aortic atherosclerosis in an LDLR-/- mouse model within six months. *Mol Cell Biochem*. 2000;215:123-8.
158. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 1998;98:300-7.
159. Peeling RW, Brunham RC. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. *Emerg Infect Dis*. 1996;2:307-19.
160. Scholze J, Dominiak P. [Therapy of hypertension between claims and reality]. *Fortschr Med*. 1996;114:26-8.
161. Doyle AE. Autonomic and vascular mechanism in hypertension. *Singapore Med J*. 1973;14:391-2.
162. Dzau VJ. Mechanism of action of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in hypertension and heart failure. Role of plasma versus tissue ACE. *Drugs*. 1990;39 Suppl 2:11-6.
163. Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*. 2001;37:1047-52.
164. Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y. Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC varepsilon and PKCbeta. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1377-85.
165. Re RN. The clinical implication of tissue renin angiotensin systems. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16:317-27.
166. Gross V, Lippoldt A, Bohlender J, Ganten D, Ganten U, Luft FC. The renin-angiotensin system and renal function in transgenic (mRen2)27 rats. *Exp Nephrol*. 1996;4 Suppl 1:20-6.
167. Bader M, Ganten D. Transgenic rats: tools to study the function of the renin-angiotensin system. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1996;3:S81-7.

168. Wagner J, Thiele F, Ganten D. The renin-angiotensin system in transgenic rats. *Pediatr Nephrol.* 1996;10:108-12.
169. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med.* 2001;79:76-102.
170. Mervaala EM, Muller DN, Park JK, Schmidt F, Lohn M, Breu V, Dragun D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension.* 1999;33:389-95.
171. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H. Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension.* 1999;33:212-8.
172. Muller DN, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Haller H, Luft FC. Angiotensin-induced inflammation and vascular injury. *Contrib Nephrol.* 2001;138-52.
173. Dzau VJ, Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation.* 1994;89:493-8.
174. Mervaala E, Muller DN, Schmidt F, Park JK, Gross V, Bader M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension.* 2000;35:587-94.
175. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E, Breu V, Loffler BM, Ganten D, Schneider W, Haller H, Luft FC. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension.* 2000;36:282-90.
176. Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, Theuer J, Breu V, Mackman N, Luther T, Schneider W, Gulba D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol.* 2000;157:111-22.
177. Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Muller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension.* 2001;37:414-8.
178. Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, Theuer J, Breu V, Mackman N, Luther T, Schneider W, Gulba D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy [In Process Citation]. *Am J Pathol.* 2000;157:111-22.
179. Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 2002;2:3.
180. Osterud B. Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost.* 1997;78:755-8.

181. Muller DN, Mullally A, Dechend R, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Loffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aebi JD, Haller H, Luft FC. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension*. 2002;40:840-6.
182. Mervaala E, Muller DN, Park JK, Dechend R, Schmidt F, Fiebeler A, Bieringer M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. 2000;35:360-6.
183. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, Dechend R, Mervaala E, Hampich F, Fiebeler A, Ju X, Finckenberg P, Theuer J, Viedt C, Kreuzer J, Heidecke H, Haller H, Zenke M, Luft FC. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol*. 2002;161:1679-93.
184. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*. 1998;396:77-80.
185. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*. 1998;98:839-44.
186. Zucchelli P, Zuccala A. The kidney as a victim of essential hypertension. *J Nephrol*. 1997;10:203-6.
187. Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol*. 1988;255:F563-73.
188. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 1999;12:205S-213S.
189. Wintroub BU, Klickstein LB, Dzau VJ, Watt KW. Granulocyte-angiotensin system. Identification of angiotensinogen as the plasma protein substrate of leukocyte cathepsin G. *Biochemistry*. 1984;23:227-32.
190. Stroth U, Unger T. The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33:S21-8; discussion S41-3.
191. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5:73-9.
192. Unger T, Azizi M, Belz GG. Blocking the tissue renin-angiotensin system: the future cornerstone of therapy. *J Hum Hypertens*. 2000;14 Suppl 2:S23-31.
193. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991;17:626-35.
194. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, Pedrazzini T. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1998;31:1324-30.
195. Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, Park JK, Dechend R, Bieringer M, Shagdarsuren E, Breu V, Haller H, Luft FC. Mineralocorticoid receptor affects

- AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension*. 2001;37:787-93.
196. Park JK, Fiebeler A, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Abou-Rebyeh F, Luft FC, Haller H. Lacidipine inhibits adhesion molecule and oxidase expression independent of blood pressure reduction in angiotensin-induced vascular injury. *Hypertension*. 2002;39:685-9.
 197. Park JK, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Schmidt F, Bieringer M, Schafer O, Lindschau C, Schneider W, Ganten D, Luft FC, Haller H. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int*. 2000;58:1420-30.
 198. Brasier AR, Recinos A, 3rd, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1257-66.
 199. Jobin C, Sartor RB. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection [In Process Citation]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C451-62.
 200. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:27-33.
 201. Dechend R, Gieffers J, Dietz R, Joerres A, Rupp J, Luft FC, Maass M. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition reduces Chlamydia pneumoniae-induced cell interaction and activation. *Circulation*. 2003;108:261-5.
 202. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 1997;29:366-73.
 203. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002;91:406-13.
 204. Tomita N, Azuma H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Gene therapy with transcription factor decoy oligonucleotides as a potential treatment for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets*. 2003;4:339-46.
 205. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:881-900.
 206. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int*. 2000;57:2285-98.
 207. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*. 1998;339:1448-56.
 208. Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T. Salicylates inhibit I κ B- α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol*. 1996;156:3961-9.

209. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994;265:956-9.
210. Chesley LC. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int*. 1980;18:234-40.
211. Lindheimer MD. Pre-eclampsia-eclampsia 1996: preventable? Have disputes on its treatment been resolved? *Curr-Opin-Nephrol-Hypertens*. 1996;5:452-8.
212. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179:1359-75.
213. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*. 2003;41:437-45.
214. Dekker GA. Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1999;42:422-35.
215. Redman CW, Roberts JM. Management of pre-eclampsia. *Lancet*. 1993;341:1451-4.
216. Coomarasamy A, Honest H, Papaioannou S, Gee H, Khan KS. Aspirin for prevention of preeclampsia in women with historical risk factors: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2003;101:1319-32.
217. Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol*. 2000;24:24-8.
218. Morgan L, Baker P, Pipkin FB, Kalsheker N. Pre-eclampsia and the angiotensinogen gene. *Br-J-Obstet-Gynaecol*. 1995;102:489-90.
219. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1991;98:648-55.
220. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? [see comments]. *J-Clin-Invest*. 1997;99:2152-64.
221. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation*. 2002;9:147-60.
222. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am-J-Hypertens*. 1991;4:700-8.
223. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*. 2002;19:103-11.
224. Kuller JA, D'Andrea NM, McMahon MJ. Renal biopsy and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184:1093-6.
225. Gaber LW, Spargo BH, Lindheimer MD. Renal pathology in pre-eclampsia. *Baillieres-Clin-Obstet-Gynaecol*. 1994;8:443-68.
226. van Beek E, Ekhardt TH, Schiffrers PM, van Eyck J, Peeters LL, de Leeuw PW. Persistent abnormalities in plasma volume and renal hemodynamics in patients

- with a history of preeclampsia. *Am-J-Obstet-Gynecol.* 1998;179:690-6.
227. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. Part 2: experimental and genetic considerations. *Obstet Gynecol Surv.* 2002;57:619-40.
 228. Wilson ML, Goodwin TM, Pan VL, Ingles SA. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv.* 2003;58:39-66.
 229. Morgan T, Craven C, Lalouel JM, Ward K. Angiotensinogen Thr235 variant is associated with abnormal physiologic change of the uterine spiral arteries in first-trimester decidua. *Am-J-Obstet-Gynecol.* 1999;180:95-102.
 230. Vinatier D, Monnier JC. Pre-eclampsia: physiology and immunological aspects [see comments]. *Eur-J-Obstet-Gynecol-Reprod-Biol.* 1995;61:85-97.
 231. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? [see comments]. *J-Clin-Invest.* 1997;99:2139-51.
 232. Austgulen R, Lien E, Vince G, Redman CW. Increased maternal plasma levels of soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997;71:53-8.
 233. Morgan T, Craven C, Ward K. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1998;32:683-7.
 234. Gaunt G, Ramin K. Immunological tolerance of the human fetus. *Am J Perinatol.* 2001;18:299-312.
 235. Dekker GA, Robillard PY, Hulsey TC. Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies. *Obstet Gynecol Surv.* 1998;53:377-82.
 236. Roberts JM. Angiotensin-1 receptor autoantibodies: A role in the pathogenesis of preeclampsia? [editorial; comment]. *Circulation.* 2000;101:2335-7.
 237. Waite LL, Atwood AK, Taylor RN. Preeclampsia, an implantation disorder. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3:151-8.
 238. Dekker GA, van Geijn HP. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Part I: Primary prevention. Therapeutic perspectives. *J Perinat Med.* 1996;24:99-117.
 239. Haller H, Ziegler EM, Homuth V, Drab M, Eichhorn J, Nagy Z, Busjahn A, Vetter K, Luft FC. Endothelial adhesion molecules and leukocyte integrins in preeclamptic patients. *Hypertension.* 1997;29:291-6.
 240. Haller H, Hempel A, Homuth V, Mandelkow A, Busjahn A, Maasch C, Drab M, Lindschau C, Jupner A, Vetter K, Dudenhausen J, Luft FC. Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet.* 1998;351:945-9.
 241. Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol.* 1999;23:24-33.
 242. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1

- receptor. *J-Clin-Invest*. 1999;103:945-52.
243. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol*. 1999;6:342-8.
 244. Baker PN, Kilby MD, Pipkin FB. Angiotensin II-induced increases in platelet intracellular free calcium in hypertensive and normotensive pregnancy [letter; comment]. *Am-J-Obstet-Gynecol*. 1993;169:749-50.
 245. Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, Warnecke C, Fleck E. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med*. 1996;74:233-51.
 246. Baker PN, Broughton Pipkin F, Symonds EM. Platelet angiotensin II binding sites in normotensive and hypertensive women. *Br-J-Obstet-Gynaecol*. 1991;98:436-40.
 247. Bes A, Corvol P, Dzau VJ, Fillastre JP, Lekieffre J, Passa P, Vasmant D, Waeber B, Zanchetti A. Circulating and tissue renin-angiotensin system: present and future. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;14 Suppl 4:S60-65.
 248. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept*. 2000;90:19-25.
 249. Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*. 2002;23:359-72.
 250. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001;357:53-6.
 251. Leung PS, Tsai SJ, Wallukat G, Leung TN, Lau TK. The upregulation of angiotensin II receptor AT(1) in human preeclamptic placenta. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;184:95-102.
 252. Luther HP, Homuth V, Wallukat G. Alpha 1-adrenergic receptor antibodies in patients with primary hypertension. *Hypertension*. 1997;29:678-82.
 253. Wallukat G, Nissen E. Anti beta1-adrenoceptor autoantibodies analyzed in spontaneously beating neonatal rat heart myocyte cultures-comparison of methods. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001;37:175-6.
 254. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation*. 2001;103:2681-6.
 255. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:2505-12.
 256. Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16:5-15.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Dietz. Er hat über all die Jahre meine wissenschaftliche Tätigkeit unterstützt. Ohne seine „Rückendeckung“ und den Entfaltungsspielraum, den er mir, wenn immer möglich und mit der klinischen Tätigkeit vereinbar, gewährte, wäre eine wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen. Er hat mich von der Notwendigkeit der „molekularen Medizin“ überzeugt und meine weitere Entwicklung gefördert.

Herrn Professor Dr. Dietrich Gulba bin ich für die vorbehaltlose und immerwährende Unterstützung, die fruchtbare Diskussion, und die Erkenntnis, dass man auch „konstruktiv Streiten“ kann sehr dankbar. Er hat nie versucht, aus mir eine Kopie seiner Person zu machen, sondern ermutigt, eigene wissenschaftliche Wege zu gehen. Bereits im Studium, noch vor Beginn der Doktorarbeit, habe ich immer das Gefühl gehabt, dass er meine Arbeit freundschaftlich fördert.

Dr. Achim Leutz hat mich an das wissenschaftlichen Arbeiten herangeführt und damit den Grundstock für die weiteren Projekte gelegt. Von ihm und seinen Mitarbeitern, insbesondere von Stephane Ansieau habe ich die essentielle Prinzipien des wissenschaftlichen Arbeitens beigebracht bekommen. Diese fast drei Jahre der „reinen Wissenschaft“ werde ich nie vergessen.

Meinem Freund Herrn Dr. Dominik Müller, mit dem ich seit 1998 zusammenarbeiten darf, danke ich für die stets gute Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Diskussionen und seine Art, mit viel Spass und Freude, Wissenschaft durchzuführen. Insbesondere danke ich ihm für das Verständnis, wenn meine klinischen Verpflichtungen zu einer Mehrbelastung für ihn wurden.

Frau Karin Dressler hat meine Arbeit durch ihren großen Einsatz bei der Durchführung der Versuche, durch ihre kollegiale Zusammenarbeit und die vielen kritischen Anmerkungen, sehr unterstützt. Durch ihre „meinungsfreudige Persönlichkeit“ wurde es auf jeden Fall nie langweilig. Seit sie in Rente gegangen ist, vermisse ich sie wirklich.

Meinem Lehrer und Mentor Herrn Prof. Dr. Luft gilt ebenfalls mein besonderer Dank. Sein unendliches klinisches Wissen, seine innere Motivation, seine uneigennützig Art mir zu helfen, die Zeit und Mühe, die er in mich investiert hat, bewundere ich. Besonders beeindruckend sind sein konsequentes, systematisches Aufarbeiten, sein tiefes patho-physiologisches Verständnis und das stets selbstkritische Beleuchten der erhobenen Daten. Besonders danke ich ihm dafür, dass er mir vermittelt hat, dass die gesamten wissenschaftlichen Bemühungen zu einem Nutzen des Patienten führen müssen, wie wichtig „evidence-based medicine“ ist, denn im Augenblick „haben wir wenige Patienten geheilt, einigen geholfen und alle getröstet“.

Die wissenschaftlichen Arbeiten sind das Ergebnis von Kollaborationen im In- und Ausland. Ohne die Hilfe von vielen Kollegen wären die Ergebnisse nicht entstanden. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Jürgen Theuer, Priv. - Doz. Dr. Jörg Kreuzer, Dr. Harald Heidecke, Dr. Joon-Keun Park, Dr. Eero Mervaala, Dr. Anette Fiebeler, Dr. Duska Dragun, Dr. Gerd Wallukat, Dr. Ruth Schmidt-Ulrich, Franziska Hampich, Alex Mullally, Peter Barta, Erdenechimeg Shagdarsuren, Markus Bieringer, Prof. Matthias Maass, Priv. - Doz. Dr. Claus Scheidereit, Dr. Bernhard Pilz, Mathilde Schmidt, Gabi N'diaye, May-Britt Köhler, Reika Langanki, Prof. Hermann Haller, Prof. Jim Roberts, Prof. Carl Hubel, Dr. Stephane Ansieau und Priv. – Doz. Dr. Volker Homuth

Besonders möchte ich meiner Frau Susanne danken, die in all den Jahren viel Verständnis für die langen Abende und Wochenenden im Labor aufgebracht hat, die mit mir „durch alle Höhen und Tiefen der Arbeit“ gegangen ist und mir immer das Gefühl gegeben hat, wir gehören zusammen. Ihr und Johanna habe ich alles zu verdanken.

Meinen Eltern Christa und Hans Dechend und meinem Bruder Frank möchte ich danken, dass Sie immer für mich da waren , dass Sie soviel Liebe und Zeit in mich investiert haben und dafür dass ich eine Familie habe. Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen.

Eidesstattliche Versicherung

Gemäß der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, an Eides statt:

- daß keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind
- daß weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- daß die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden
- daß die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind
- daß mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Berlin, den 12.09.2003 Dr. Ralf Dechend

Lebenslauf

Name	Dr. med. Ralf Dechend
Anschrift	Bahnhofstr. 163, 16359 Biesenthal
Geburtsdatum	20.05.1966
Geburtsort	Hannover
Familienstand	verheiratet mit Susanne Dechend, geb. Warnke
Staatsangehörigkeit	deutsch
Kinder	Johanna Lara Dechend, geb. 22.04.2000
Schulzeit	1972 - 1976 Grundschule Rethen 1976 - 1985 Gymnasium St. Ursula Schule, Hannover Juni 1985 Abitur
Wehrdienst	1985 - 1986 Sanitätssoldat
Medizinstudium	1986 - 1993 Medizinische Hochschule Hannover
Auslandsaufenthalte	1991 Charing Cross, London / Royal Liverpool Medical School, Liverpool Hospital for Sick Children in Great Ormond Street, London, England 1993 Brown University, Rhode Island, USA (Praktisches Jahr)
Arzt im Praktikum	01.12.1993 - 31.05.1995 AIP an der Franz-Volhard Klinik, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Humboldt Universität zu Berlin
weitere Ausbildung	01.06.1995 - 30.03.1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Franz-Volhard Klinik 01.04.1996 - 01.04.1998 DFG-Stipendium am Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin seit 01.04.98 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Franz-Volhard Klinik 2002 Internist seit 12/2002 Oberarzt in der Franz-Volhard Klinik Schwerpunkte: Hypertonie, Hämostasiologie, nicht invasive Bildgebung Forschung: vaskuläre Medizin, kardiovaskulärer Endorganschaden, Präeklampsie, Hypertonie
Promotion	"Untersuchungen zum potenzierenden Effekt von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin auf die thrombolytische Aktivität von Thrombolytika unter besonderer Berücksichtigung eines direkten pro-fibrinolytischen Effektes" (Prof. Gulba / Prof. Lichtlen) an der Medizinischen Hochschule Hannover 1995 "magna cum laude"
Stipendien	1991 Dr. Carl Duisberg Stiftung zur Fortbildung von deutschen Studierenden der Medizin, Bayerwerke 1993 BMEP (Biomedical Sciences Exchange Programm between North America and Europe) in Kooperation mit dem DAAD 1996-1998 DFG- Stipendium (AGDr. Leutz am Max-Delbrück Zentrum)
Preise	1994 Erwin Deutsch Poster Preis (2. Preis) (klinische Wissenschaft) verliehen von der

Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (GTH)

2000 Young investigator Award der „International Society For The Study OF Hypertension in Pregnancy“, ISSHP, Paris, April 2000

Gewinner des 1. Research Prizes während des "Update in Thrombolysis", Wien, Oktober 2000, überreicht von der Deutschen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase und Lilly-Europa

Gewinner des Jan Brod Preises der Medizinischen Hochschule Hannover, Nov. 2000

Young investigator Award 2000 der Deutschen Hochdruckliga, Heidelberg, Nov. 2000

European Young Investigator Award der "American Heart Association" auf dem "Council Meeting for High Blood Pressure Research" in Chicago 2001

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Münster 2001

Gewinner des Dr. Adalbert Buding Preis 2002 der Deutschen Hochdruckliga

Berlin, den 11. September 2003

(Ralf Dechend)